

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Michal Smetana

Pohlavní rozdíly v apoptóze v myokardu u pacientů po transplantaci srdce

**Gender differences in myocardial apoptosis of the patients after heart
transplantation**

Dizertační práce

Školitel: doc. MUDr. Ondřej Szárszoi, PhD.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem řádně uvedl/a a citoval/a všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne,

MUDr. Michal SMETANA

Podpis:

Identifikační záznam:

Smetana, Michal. *Pohlavní rozdíly v apoptóze v myokardu u pacientů po transplantaci srdce.* [*Gender differences in myocardial apoptosis of the patients after heart transplantation*]. Praha, 2018. 90 s., Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika kardiovaskulární chirurgie IKEM. Školitel Szárszoi, Ondrej.

Poděkování

Je mou milou povinností na tomto místě poděkovat všem spolupracovníkům, bez kterých by vytvoření této dizertační práce bylo mnohem těžší.

Veliký dík patří mému školiteli doc. MUDr. Ondreji Szárszoiovi, PhD. za jeho odborné vedení, neutuchající ochotu, trpělivost, rady a cenné připomínky při tvorbě mé dizertační práce.

Nelze nepoděkovat panu prof. MUDr. Janu Pirkovi, DrSc., který stál u zrodu výzkumné práce a svým přístupem vytvořil podmínky k zahájení i dokončení výzkumu v náročném provozu klinického pracoviště. Rovněž bych rád poděkoval za podporu při realizaci projektů doc. MUDr. Ivanu Netukovi, PhD.

Zvláštní poděkování patří kolegyním RNDr. Aleně Lodererové a MUDr. Janě Maluškové z Oddělení klinické a transplantační patologie IKEM, bez jejich pomoci by velká část laboratorní práce nebyla uskutečnitelná.

Za motivaci k dokončení dizertační práce děkuji prof. MUDr. Janu Vojáčkovi, PhD.

Tolerance, zázemí a podpora, které mi poskytuje má rodina, byly základním předpokladem pro vytvoření předkládané práce. Děkuji.

Studie byla podporována grantem: NT/11269 – 5 IGA

Abstrakt

Pohlavní rozdíly v apoptóze v myokardu u pacientů po transplantaci srdce

Úvod: Mnoho metabolických i strukturálních funkcí kardiiovaskulárního systému je ovlivněno pohlavím jedince. Cílem naší práce bylo zjistit citlivost dárcovského ženského a mužského myokardu k perioperační ischemii, jak organizmus ovlivňuje dárcovský myokard druhého pohlaví (sledovaným faktorem byla apoptóza) po transplantaci srdce a zda sledované biomarkery mohou predikovat primární selhání srdečního štěpu (PGD). **Materiál a metodika:** Výzkum byl rozdělen do třech prospektivních studií. Studie 1 zahrnovala 81 pacientů, kteří podstoupili transplantaci srdce od září 2010 do ledna 2013 a byli rozděleni do dvou skupin podle pohlaví dárce. K průkazu myokardiální nekrózy jsme použili metodu „high sensitive cardiac TnT“ (hs-cTnT). Apoptóza byla stanovována imunohistochemickou detekcí kaspázy-3, Bcl-2 a metodou TUNEL z bioptických vzorků. Studie 2 zahrnovala 58 pacientů rozdělených do čtyř skupin podle pohlaví příjemce a dárce. Během dvouletého sledování byla analyzována apoptóza (kaspáza-3, Bcl-2, TUNEL) v jednotlivých skupinách. Ve Studii 3 bylo 64 pacientů. Pomocí uvedených biomarkerů jsme zjišťovali souvislost s rozvojem PGD po transplantaci. **Výsledky:** U dárců ženského pohlaví byla hladina hs-cTnT významně vyšší již před transplantací ($P=0,025$). Hladiny hs-cTnT byly významně vyšší i po transplantaci ve skupině s ženskými allografty. Ve Studii 2 nebyly významné rozdíly mezi skupinami v expresi kaspázy-3, Bcl-2 a četnosti TUNEL pozitivních buněk. Ve všech skupinách jsme pozorovali významný nárůst apoptózy detekované metodou TUNEL oproti předoperačním hodnotám ($P<0,001$). V souboru pacientů ve Studii 3 se u osmi (14%) pacientů rozvinulo PGD. Nejistili jsme rozdíly mezi skupinou pacientů s PGD a bez PGD v plazmatických hladinách hs-cTnT, ani v apoptóze. **Závěr:** U dárců srdce ženského pohlaví jsme zjistili větší nekrotické poškození myokardu. Při dvouletém sledování apoptózy v transplantovaných srdcích jsme nepozorovali rozdíly v závislosti na pohlaví příjemce a dárce. Sledované biomarkery není možné jednoznačně použít jako prediktory PGD.

Klíčová slova: Transplantace srdce, apoptóza, pohlavní rozdíly

Abstract

Gender differences in myocardial apoptosis of the patients after heart transplantation

Background: Many functions of the cardiovascular apparatus are influenced by gender. The aim of our study was to find out the sensitivity to perioperative ischemia of the donor female and male myocardium; and determine how the organism affects the donor myocardium of the other sex after heart transplantation (detection of apoptosis), and whether the investigated biomarkers can predict primary graft dysfunction (PGD). **Methods:** The research was divided into three prospective studies. The Study 1 included 81 patients undergoing heart transplantation from September 2010 to January 2013. Patients were divided into two groups according to male allograft and female allograft. In order to prove myocardial necrosis the high-sensitive cardiac troponin T (hs-cTnT) method was used. Apoptosis was determined by immunohistochemical detection of caspase-3, Bcl-2, and by the TUNEL method. The Study 2 included 58 patients divided into four groups according to gender; both of the recipient and the donor. Apoptosis (caspase-3, Bcl-2, TUNEL) was analysed in these groups during the two-year follow-up. In Study 3 64 patients were involved. We investigated the relationship in between these biomarkers and the development of PGD after transplantation. **Results:** We observed a significantly higher level of hs-cTnT in female donors before transplantation ($P=0,025$); as well as in the female allograft group after transplantation throughout the monitored period. In the Study 2, there were no differences in apoptosis between the groups. All groups showed a significant increase of TUNEL-positive myocytes after transplantation ($P<0,001$). In the third study, 14 % of transplant recipients developed PGD. We did not find differences between the groups in regard to hs-cTnT serum levels. There were also no differences in apoptosis between PGD and without PGD groups. **Conclusions:** We found out greater necrotic damage of the myocardium of female donors. During the two year follow-up, we did not observed differences in apoptosis in transplanted hearts which could be attributed to gender of the recipient and the donor. The monitored biomarkers were not predictors of PGD.

Key words: Heart transplantation, apoptosis, gender differences

Obsah

1.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
2.	HISTORICKÝ PŘEHLED	11
3.	ÚVOD	13
3.1.	Ischemie myokardu	16
3.1.1.	Metabolické změny vyvolané ischemií	17
3.1.2.	Reperfuční poškození myokardu	18
3.2.	Nekróza	19
3.2.1.	Troponin	20
3.3.	Apoptóza	21
3.3.1.	Vnější signální dráha apoptózy	24
3.3.2.	Vnitřní signální dráha apoptózy	25
3.3.3.	Aktivace efektorových kaspáz – konečná fáze apoptózy	27
3.3.4.	Kontrola a regulace apoptózy	28
3.3.4.1.	Proteiny rodiny Bcl-2	28
3.3.4.2.	Protein p53	30
3.3.4.3.	Vzájemné propojení obou apoptotických signálních drah	31
3.3.4.4.	Kaspázy	33
3.3.4.4.1.	Kaspáza-3	34
3.3.4.5.	Protein Bcl-2	35
3.4.	Pohlavní rozdíly	36
3.4.1.	Pohlavní rozdíly v kardiovaskulárním systému za fyziologických podmínek	37
3.4.2.	Pohlavní rozdíly v kardiovaskulárním systému za patologických podmínek	39
3.4.3.	Apoptóza v myokardu	42
3.5.	Selhání dárcovského štěpu po transplantaci srdce	43
4.	HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	45
4.1.	Dílčí cíle dizertační práce	45
5.	METODIKA A VÝSLEDKY	46
5.1.	Stanovení vysoce citlivého kardiálního troponinu T (hs-cTnT)	46
5.2.	Detekce apoptózy	47
5.3.	Studie 1	48
5.3.1.	Pacienti a sběr dat	48
5.3.2.	Statistické zpracování	49
5.3.3.	Výsledky Studie 1	49
5.4.	Studie 2	57
5.4.1.	Pacienti a sběr dat	57
5.4.2.	Statistické zpracování	57
5.4.3.	Výsledky Studie 2	58
5.5.	Studie 3	62
5.5.1.	Pacienti a sběr dat	62
5.5.2.	Statistické zpracování	63
5.5.3.	Výsledky Studie 3	63
6.	DISKUZE	68
7.	ZÁVĚR	76
8.	LITERATURA	78
9.	PŘEHLED VLASTNÍCH PUBLIKACÍ	90

1. Seznam použitých zkratek

AIF	faktor indukující apoptózu (apoptosis inducing factor)
AKT	serin-threoninová kinasa
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor-1
ATP, dATP	adenosintrifosfát, deoxyadenosintrifosfát
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein
Bcl-Xl	B-cell lymphoma-extra large
BH	Bcl-2 homologní doména
BH3-only	proteiny Bcl-2 rodiny
CAD	caspase-3 activated DNase
CARD	caspase recruitment domain
CKTCH	Centrum kardiovaskulární a transplantační chirurgie
cTnT	cardiac specific troponin T
cyt c	cytochrom c
DAB	diaminobenzidin
DED	doména smrti (death domain)
DISC	death-inducing signaling complex
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOPA	dihydroxyfenylalanin
dUTP	deoxyuridintrifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EMB	endomyokardiální biopsie
ER	endoplasmatické retikulum

FADD	Fas associated death domain
FasL	Fas ligand
FasR	Fas receptor
FLIP	FLICE inhibitory protein
H&E	hematoxylin-eosin
hs-cTnT	high-sensitivity cardiac troponin T
IAPs	inhibitors of apoptosis proteins
ICAD	inhibitor of caspase-3 activated DNase
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
ISHLT	The International Society for Heart and Lung Transplantation
MDM2	mouse double minute 2 homolog
mPTP	mitochondrial permeability transition pore
NF- κ D	nuclear factor kappa D
NO	oxid dusnatý
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
OTS	ortotopická transplantace srdce
PGD	primary graft dysfunction
Smac	second mitochondria-derived activator of caspases
tBid	truncated Bid
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TNFR	TNF receptor
TNF- α	tumor-nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor alpha)
TRADD	TNF-R-associated death domain

TRAF	TNF receptor-associated factor
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R2	TRAIL receptor 2 (killer/DR5 receptor)
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labelling
WD-40	krátký, opakující se strukturální motiv přibližně 40 aminokyselin
XIAP	X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein

2. Historický přehled

Asi není jiný orgán, který je tak opředen mýty jako srdce. Často bývá v mnohých kulturách symbolem pro lásku, odvahu, statečnost, bojovnost i sebeobětování. Starověk spatřoval v srdci sídlo duše. V Egyptě se srdce po smrti vážilo pro zjištění pravdy o mrtvém. Podle Řeků bylo srdce něco jako kovářská výheň, kde se spalují nečistoty v krvi. Galén, slavný lékař starověkého Říma, připisoval srdci úlohu ohříváče, který nasává krev, spaluje ji, a tak vyrábí teplo pro celé tělo. Jeho názor se udržel ve vědeckých kruzích až do sedmáctého století, kdy vstoupil na scénu anglický lékař William Harvey, objevitel krevního oběhu. Pozorováními na zvířatech a zkoumáním lidského těla zjistil, že srdce je výkonná pumpa, která v cévách pohání krev. Proto se snažíme tento doslova život rozdávající orgán chránit, léčit a podle možností doby i uzdravovat.

Již odpradávná lidé přemýšlejí, jak nahradit poškozené nebo ztracené části lidského těla. První nevědecké pokusy započaly ve starověku, kdy čínští chirurgové transplantovali svým pacientům tkáň i orgány. Vědecká éra započala až na počátku 20. století; jsou popisovány pokusy s heterotopickou transplantací srdce u psů experimentálním francouzským chirurgem Alexisem Carrelem. Jedna z prvních zmínek o možnosti transplantace srdce u lidí byl článek „Tendencies in Pathology” amerického vědce Simona Flexnera, který přednesl v roce 1907 na univerzitě v Chicagu a pojednával o teoretické možnosti chirurgické výměny nemocných orgánů za zdravé (Cohn a Edmunds 2003). Po řadě experimentů byl transplantační zákrok poprvé úspěšně proveden u člověka v roce 1954, kdy 23-letému pacientovi daroval svou ledvinu jeho sourozenec (jednovaječné dvojče). V 60. letech minulého století se postupně začaly transplantovat ostatní orgány jako játra, plíce i srdce. Byly tak položeny základy k zahájení klinického programu. Velkým problémem byl v tomto období odběr srdečního štěpu, neboť nebyl akceptován koncept mozkové smrti. Z těchto důvodů při první transplantaci srdce člověku v roce 1964 nebylo použito lidské srdce. James D. Hardy implantoval umírajícímu pacientovi zdravé srdce šimpanze, které fungovalo po dobu 90 minut, a pak pacient zemřel na operačním sále (Hardy a spol. 1964). Na vývoji chirurgické techniky transplantace srdce se podíleli zejména američtí chirurgové Norman Shumway a Richard Lower ze Stanfordské univerzity. Nicméně první úspěšnou transplantaci srdce pomocí jejich operační techniky u člověka provedl 3. prosince roku 1967 Christiaan Barnard v Kapském Městě. Příjemcem byl 54letý muž, který zemřel 18. den po operaci na zánět průdušek a plic.

V roce 1968 byla provedena transplantace srdce také v tehdejším Československu. Vedl ji tým akademika Šišky. Pacientka po šesti hodinách zemřela. V začátcích transplantací srdce to nebylo nic neobvyklého. První úspěšná transplantace srdce v České republice byla provedena pod vedením profesorů Firta, Fabiána a Kočandrlého 31. ledna 1984 v pražském IKEM. IKEM se tak stal vůbec prvním centrem v rámci bývalého východního bloku, kde byl program transplantace srdce úspěšně zaveden (Pirk a Málek 2008). Od té doby bylo v IKEM provedeno již více než 1000 srdečních transplantací.

Úmrtnost v počátcích transplantací byla skutečně vysoká, jednoleté přežívání po srdeční transplantaci dosahovalo hodnot pouze okolo 25%. Po řadě neúspěšných pokusů a celkové skepsi nastává průlom až v 80. letech s objevením imunosupresivního léku cyklosporinu A. Jeho zavedení do klinické praxe s pravidelnými kontrolami dárcovského myokardu pomocí endomyokardiálních biopsií (EMB) zásadně ovlivnilo šanci pacientů na přežití. Byl to začátek nové éry úspěšných srdečních transplantací. Následně s rozvojem dalších imunosupresivních léků jako tacrolimus, azathioprin, mykofenolát mofetil, prednison se dále zlepšovaly pooperační výsledky, klesala morbidita i mortalita. Nyní je jednoleté přežívání udáváno u 80 % pacientů, pětileté kolem 70 % a desetileté u 60 % pacientů. Průměrná doba pooperačního přežití je 15 let. Po celém světě se v současnosti za rok provede přibližně 5000 transplantací srdce v 500 specializovaných centrech (obrázek č. 1), největší počet operací je uskutečněn v severní Americe (Lund a spol. 2017).

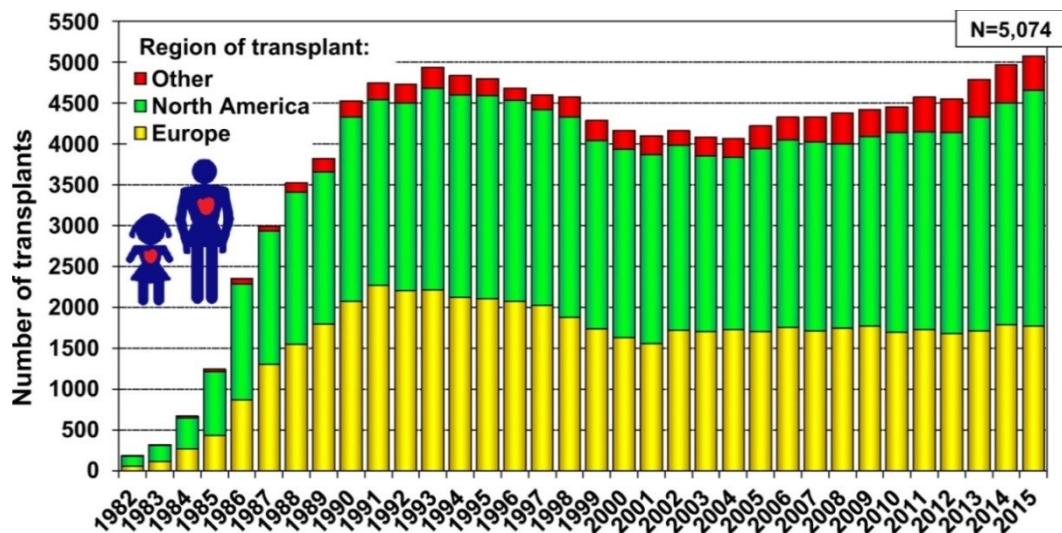
3. Úvod

Celosvětově počet pacientů se srdečním selháním roste. Konečné stadium srdečního selhání je spojeno s významnou morbiditou, která vede k nárůstu opakovaných hospitalizací, intervencí a taktéž větší spotřebě léků. Pro pacienty trpící tímto onemocněním to znamená výrazný pokles kvality života a zvýšenou úmrtnost. Rovněž z ekonomického hlediska je srdeční selhání velmi nepříznivý faktor.

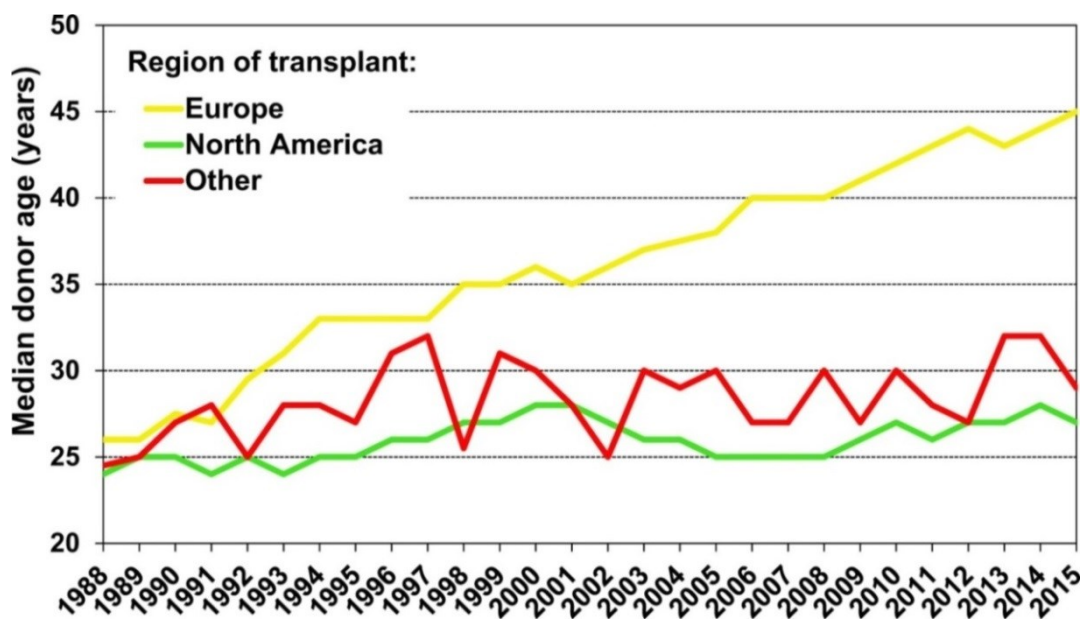
V České republice je provedeno 6 až 7 srdečních transplantací na 1 000 000 obyvatel za rok; tedy asi 70 pacientů ročně dostane nové srdce. Legislativně je potenciálním dárce každý, kdo se před smrtí nenechá zapsat do registru nedárců. Nicméně běžnou praxí je řídit se přáním rodiny zemřelého. Na čekací listině pro transplantaci srdce v ČR je 52 % pacientů s diagnózou dilatační kardiomyopatie a 40 % pacientů s pokročilou ischemickou chorobou srdeční. Transplantaci srdce v ČR provádí dvě střediska: Institut klinické a experimentální medicíny v Praze a Centrum kardiovaskulární a transplantační chirurgie v Brně (Pirk a spol. 2008).

Transplantace srdce se pro mnohé pacienty se srdečním selháním stala jedinou možnou léčbou. Obrovské pokroky v medicíně, zejména v oblasti imunosuprese, přeměnily to, co bylo kdysi považováno za experiment do rutinního léčebného postupu, který je dostupný téměř po celém světě (obrázek č. 1). V podstatě je to chirurgická metoda, která je však součástí širokého programu léčby srdečního selhání, na němž se významnou mírou podílí nejenom kardiochirurgové, ale i kardiologové, anesteziologové, imunologové, patologové. Jako každá léčebná metoda má i transplantace srdce svá úskalí. Největším problémem současné transplantologie je nedostatek vhodných dárců k počtu potřebných pacientů. Nezřídka se v praxi setkáváme s tzv. marginálními dárci (vyšší věk, horší hemodynamický stav), kteří zajisté představují určité vyšší riziko výkonu (obrázek č. 2). Avšak pro určitou skupinu pacientů (nejčastěji urgentní a starší pacienti na čekací listině), po pečlivém zhodnocení dostupných parametrů, můžou být i tito dárce akceptováni k transplantaci. Proto je kladen velký důraz na zefektivnění a zpřesnění dárcovského programu. Snaha zajistit vhodný srdeční štěp s pravděpodobností dlouhodobě dobré funkce se stává jedním z nosných programů transplantační medicíny (Lund a spol. 2017). Vzhledem k tomu, že transplantace srdce patří mezi akutní výkony, není často pohlaví příjemce shodné s pohlavím dárce získaného štěpu. A tak se v praxi relativně běžně setkáváme s pacienty, jimž bylo transplantováno srdce opačného pohlaví.

Obrázek č. 1: Celosvětový počet transplantací srdce ve světě v období 1982 – 2015 (Lund a spol. 2017).



Obrázek č. 2: Věk dárců srdce v závislosti na geografickém rozložení a časovém období transplantace (Lund a spol. 2017).



Transplantace srdce je v podstatě přenos srdce z jednoho těla (dárce) do těla druhého (příjemce). V těle příjemce může být srdeční štěp (allograft) umístěn na jiné místo jak původní srdce, které zůstává na svém místě, potom mluvíme o heterotopické transplantaci. Tato metoda se již prakticky nepoužívá. Nebo se původní srdce odstraní a místo něj se implantuje dárcovské srdce, potom mluvíme o ortotopické transplantaci (OTS). Základním předpokladem odběru srdce je prokázaná smrt mozku, tedy úplný a trvalý zánik všech mozkových funkcí včetně funkce mozkového kmene (Černý a spol. 1998). Stojí za zmínku, že mozková smrt je provázena řadou patofyziologických dějů, které mohou způsobit závažné poškození srdečního štěpu. Jako vedoucí problém je tzv. „katecholaminová bouře“, která je provázena prudkým vzestupem krevního tlaku při generalizované vazokonstrikci. Příčinou je postupně progredující nitrolební hypertenze, kdy dochází ke kompresi cerebrálních arteriol okolních tkání s rozvojem mozkové ischemie, která má za následek aktivaci sympatiku s masivním vyplavením katecholaminů. Následná silná vazokonstrikce vede k ischemii periferních tkání s rozvojem metabolické acidózy. Koronární cirkulace je rovněž narušena. Výsledkem je různý stupeň subendokardiální ischemie až rozvoj akutního infarktu myokardu. V plicní cirkulaci způsobují tyto změny zvýšení plicní rezistence, což vede k akutnímu přetížení pravé komory, její dilataci a dysfunkci (Ranasinghe a Bonser 2011). Dále důsledkem mozkové smrti dochází ke vzniku endokrinní dysfunkce, manifestující se jako diabetes insipidus. Nedostatečná sekrece vasopresinu vede k prohloubení hypotenze, neboť vasopresin je silný vazokonstriktor a zároveň jeho nedostatek způsobuje zvýšení diurézy. Péče o dárce má proto klíčové postavení v procesu transplantace srdce. Základními pravidly jsou udržení hemodynamické stability, korekce vnitřního prostředí (zejména hypokalemie) a korekce hypovolémie.

Z hlediska kardiochirurgického spektra výkonů patří transplantace mezi operace s nejdelší dobou navozené globální ischemie. Základním předpokladem úspěchu srdeční transplantace je minimalizace doby ischemie. Je známo, že čím kratší je doba ischemie, tím lepší je dlouhodobé přežívání pacientů po transplantaci srdce (Kilic a spol. 2012). Del Rizzo a spol. již v roce 1999 publikoval, že ischemie delší než 4 hodiny je spojena s výrazně horšími výsledky po transplantaci. Z největšího mezinárodního transplantačního registru ISHLT (International Society for Heart and Lung Transplantation) vyplývá, že ischemie štěpu delší než 200 minut představuje nezávislý rizikový faktor pro jednoroční mortalitu a má významný negativní vliv na 5-leté a dokonce i na 15-leté přežití po transplantaci srdce (Stehlik 2012).

3.1. Ischemie myokardu

Důsledkem nepoměru mezi dodávkou a spotřebou kyslíku vzniká hypoxie myokardu. Podle mechanismu, vedoucího k rozvoji hypoxie, rozlišujeme základní typy hypoxie: ischemickou, hypoxickou, anemickou a histotoxickou. Omezení nebo zástava koronární perfuze je nejčastější příčinou nedostatečného zásobení srdce kyslíkem. Takto vzniklá hypoxie se označuje jako ischemická hypoxie nebo taky srdeční ischemie.

Hypoxická (systémová) hypoxie je charakterizována poklesem pO_2 v arteriální krvi při neporušeném zásobení myokardu koronárními tepnami. Jako fyziologickou můžeme kvalifikovat hypoxickou hypoxii vyskytující se u obyvatelstva trvale žijícího ve vysokých nadmořských výškách nebo ve fetálním myokardu adaptovaném na hypoxii (Ošťádal a Vízek 2005). V klinické medicíně se s tímto typem hypoxie setkáváme u pacientů s cor pulmonale nebo při cyanotických vrozených srdečních vadách.

U hypoxie anemické je arteriální pO_2 normální, ale transportní kapacita krve pro kyslík je v důsledku poklesu množství hemoglobinu snížena. S histotoxickou hypoxií se setkáváme např. při otravě kyanidem, kdy dochází k inhibici oxidativních enzymů.

Pojmy ischemie a hypoxie jsou v literatuře často zaměňovány, ačkoliv se důsledky těchto dvou mechanismů na buněčné úrovni podstatně liší (Ošťádal a Kolář 1999). Jak ischemii, tak i hypoxii charakterizuje snížená dodávka kyslíku a energetických substrátů do myokardu, ale u ischemie nedochází na rozdíl od hypoxie k odplavování vzniklých metabolitů, především laktátu a iontů vodíku (H^+). Neopomenutelným rozdílem je rovněž skutečnost, že zatímco hypoxie postihuje většinou celý myokard, ischemie bývá ohraničena pouze na oblast zásobenou postiženou věnčitou tepnou. S tím souvisí i vznik lokálních poruch kinetiky, elektrická nestabilita a vznik srdečních arytmií (Ošťádal a Kolář 1988). Při kardiochirurgických výkonech se často setkáváme s tzv. globální ischemií, postihující celý myokard. Je to uměle navozený stav během kardioplegické srdeční zástavy. Podle druhu a obtížnosti operace se délka ischemie může lišit. S nejdelším trváním této globální ischemie myokardu se setkáváme v transplantační medicíně, při vzdálených odběrech srdečního štěpu.

Ischemie vyvolává řadu patofyziologických změn myokardu, které jsou však při včasné obnově průtoku krve postiženou oblastí reverzibilní (tzv. reverzibilní ischemie), trvá-li však ischemie delší časový úsek, přechází ve fázi ireversibilního poškození buněk.

3.1.1. Metabolické změny vyvolané ischemií

Nedostatek kyslíku se projevuje v energetickém zásobení myokardu již v několika vteřinách od jejího začátku. Aerobní metabolismus se rychle snižuje a je nastartována anaerobní glykolýza, což je z energetického hlediska mnohem méně efektivní děj. Z každé molekuly glukózy se za anaerobních podmínek tvoří jen 2 molekuly ATP oproti 38 molekulám ATP produkovaným z jedné molekuly glukózy při oxidativním metabolismu. To je samozřejmě zcela nedostatečné, neboť jen k udržení iontové homeostázy potřebuje myokard za klidových podmínek 10 mmol ATP/min. Navíc dochází v důsledku anaerobní glykolýzy ke hromadění kyseliny mléčné a iontu vodíku s následným poklesem pH. Ionty vodíku ovlivňují interakci aktinu s myozinem, neboť se váží na troponin I a kompetují tak s ionty vápníku (Ca^{2+}). Acidóza vede k poruchám kontrakce.

Přibližně za 20 - 40 minut po začátku ischemie dochází k vyčerpání zásob ATP, ischemie se stává ireverzibilní. Koncentrace ATP je menší než deset procent původního stavu a zásoby glykogenu jsou vyčerpány. K rozvoji ireverzibilního poškození buňky zásadně přispívá porucha iontové rovnováhy v průběhu ischemie, především zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Narušení integrity buněčné membrány volnými kyslíkovými radikály vede k influxu vápníku z extracelulárního prostoru; menší množství Ca^{2+} se do buňky dostává i výměnou za ionty sodíku (Na^+). Hlavní podíl nicméně mají příčiny intracelulární: zvýšené vyplavování Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula při současně sníženém odstraňování Ca^{2+} z cytosolu. Zhoršené odstraňování vápníku z cytosolu v průběhu ischemie je důsledkem nedostatku energetických zdrojů vedoucích k potlačení aktivity sarkolemálního $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiportu, sarkolemální Ca^{2+} pumpy a Ca^{2+} pumpy sarkoplazmatického retikula. Kromě ischemie samotné navíc funkci obou zmíněných transportních mechanismů zhoršují ischemií indukované volné kyslíkové radikály. Zvýšená koncentrace vápníku uvnitř kardiomyocytu vede k aktivaci lysozomálních proteáz a fosfolipáz (především fosfolipázy A2 a fosfolipázy C), které se dále podílejí na poškození buněčných struktur mimo jiné taky buněčných membrán. Nedostatek ATP rovněž způsobuje inhibici Na^+/K^+ ATPázy s hromaděním Na^+ v cytosolu. To má za následek stimulaci $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiportu k výměně iontu Na^+ z cytosolu za extracelulární Ca^{2+} (Dhalla a spol. 1996), což sekundárně přispívá opět ke zvyšování intracelulární koncentrace vápníku. Narušená permeabilita buněčných membrán spolu s vyšší koncentrací Na^+ v cytosolu vedou k rozvoji intracelulárního edému myocytů a postupně k úplné ztrátě osmotické kontroly buňky. Uvedené mechanismy (energetická deplece, porucha

vápníkové buněčné homeostázy, produkce kyslíkových radikálů a ztráta osmotické kontroly) vedou nakonec k zániku buňky (Ošťádal a Vízek 2005).

3.1.2. Reperfuzní poškození myokardu

Obnovení průtoku krve s dodávkou kyslíku v ischemické oblasti označujeme termínem reperfuze. Je-li obnoven průtok krve postiženou oblastí během reverzibilní ischemie (cca 20 – 40 minut od počátku ischemie), následuje reparace myokardu ad integrum. Dojde-li však k reperfuzi později, tedy během ireverzibilní ischemie, kdy jsou již vyčerpány energetické zásoby buňky, jsou vyčerpány antioxidační mechanismy volných kyslíkových radikálů, je plně rozvinuto kalciové přetížení a buňka ztratila osmotickou kontrolu, může navíc dojít i k poškození okolních buněk, které ještě nebyly bezprostředně zasaženy nezvratným poškozením (Piper a spol. 1998). Tento jev je zapříčiněn nekontrolovanou produkcí kyslíkových radikálů. Přívod okysličené krve může způsobit, při ischemií narušených transportních mechanismech elektronů v mitochondriích, prudké zvýšení produkce volných kyslíkových radikálů v okamžiku reperfuze. Mluvíme o „kyslíkovém paradoxu“. Velká koncentrace volných kyslíkových radikálů poškozuje buněčné membrány, tento jev označovaný jako „oxidační stres“ směřuje k dalšímu poškození okolních myocytů vedoucí k nekontrolovanému influxu vápníkových iontů do nitra buňky, neboli „vápníkovému paradoxu“. Jak již bylo uvedeno, je způsoben poruchou transportních mechanismů pro kalcium (zvýšením $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiportu, zvýšeným vstupem Ca^{2+} vápníkovými kanály a také otvory v buněčné membráně, nedostatečným odstraňováním Ca^{2+} z cytosolu). Masivní kalciové přetížení („calcium overload“) vede k aktivaci lipáz, proteáz a proteinkináz, které se dále podílejí na porušení buněčné integrity.

Rovněž významnou úlohu v ischemicko-reperfuzním poškození srdce hraje mPTP pór (mitochondrial permeability transition pore, Halestrap a spol. 2004). Bylo prokázáno, že jeho blokádou se snižuje velikost infarktového ložiska (Clarke a spol. 2002). Otevření mPTP způsobují procesy během počáteční fáze reperfuze: vzestup hladiny vápníku, pokles membránového potenciálu mitochondrií, zvýšená hladina anorganického fosfátu, změny v pH, pokles hladiny makroergních fosfátů a zvýšená koncentrace volných kyslíkových radikálů. Následkem otevření póru je pak ztráta membránového potenciálu mitochondrie, snížení oxidativního metabolismu, bobtnání mitochondrií s redukcí krist a poškození vnější mitochondriální membrány. Tyto skutečnosti vedou k zániku mitochondrie a mají negativní dopad na existenci buňky.

Další mechanismus podílející se na ischemicko-reperfuzním poškození popsal Piper a spol. (1998) a Karmazyn (1990), upozornili na způsob obnovy pH při reperfuzi. Rychlá normalizace pH je podmíněna činností Na^+/H^+ antiportu a $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ symportu. Zvýšená funkce Na^+/H^+ antiportu má za následek vzestup cytosolické koncentrace Na^+ , což vede k aktivaci $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiportu a růstu koncentrace Ca^{2+} intracelulárně. Nárůst koncentrace sodíkových iontů intracelulárně vede k rozvoji intracelulárního edému. Tlakem edematózní tkáně na kapiláry a současným zduřením endoteliálních buněk se uzavírá mikrocirkulace („no reflow“ fenomén) a pokračuje tak nekontrolovatelná spirála buněčného poškození, která nakonec vede ke smrti dalších kardiomyocytů.

Jak bylo výše zmíněno, trvá-li ischemie delší dobu, vyvíjí se ireverzibilní ischemické poškození, charakterizované buněčnou smrtí – infarkt myokardu. K zániku kardiomyocytu dochází dvojím způsobem – nekrózou a apoptózou.

3.2. Nekróza

Buněčná smrt hraje neodmyslitelnou roli jak ve fyziologických, tak takřka ve všech patologických procesech živých organismů. Je to proces, který ukončuje základní funkce buňky (dýchání, metabolismus, růst a proliferace), může být indukována jak náhodně, tak i jako důsledek aktivace specifických a regulovatelných signálních drah. Buněčná smrt byla funkčně kategorizována jako apoptóza nebo nekróza. V podstatě všechny nedávné učebnice apoptózu popisovaly jako jedinou formu programované buněčné smrti a nekrózou jako pasivní buněčnou smrt způsobenou fyzikálním traumatem. Intenzivní výzkum v posledních dvou desetiletích z části objasnil apoptotický mechanismus a odhalil další typy programované buněčné smrti jako autofagie a nekroptóza (Vandenabeele a spol. 2010).

Nekróza patří mezi základní typy buněčné smrti a je definována jako intravitální smrt buňky nebo tkáně. Vzniká působením nekrogenního faktoru (hypoxie, toxiny, fyzikální faktory, infekce atd.), který naruší vitální cytoplasmatické struktury buňky, což vede ke komplexnímu rozvratu její biologické integrity. Buňka není schopná udržet koncentrační gradienty iontů a kompartmentalizaci buňky. Dříve byla nekróza považována za proces náhodný, neregulovatelný a v podstatě patologický. Nicméně je již známo, že za určitých okolností jako je druh, intenzita, délka nekrogenního signálu, energetický stav buňky, může i nekróza být regulovaný systém mnoha dílčích událostí, které jsou spolu spřaženy a podléhají

vzájemné signalizaci jako např. signální dráha TNF- α /TNFR a serin/threonin kinázy 1 (RIP1). V takovém případě o nekróze hovoříme jako o nekroptóze. Dnes můžeme nekrózu chápat jako jednu z alternativních drah buněčné smrti (Kroemer a spol. 2009, Galluzzi a spol. 2015).

Z morfologického hlediska má nekróza několik charakteristických projevů. Buněčné jádro se svrašťuje a tmavne (pyknóza), chromatin se někdy hromadí na vnitřní straně jaderné membrány (nástěnná hyperchromatóza), pak se jádro může rozpadnout na malé fragmenty (karyorhexe) nebo se úplně ztrácí jeho barvitelnost a rozpouští se (karyolýza). V cytoplazmě roste eozinofilie, dochází k buněčnému edému, organely (hlavně mitochondrie) zduřují, dochází k vakuolizaci, disrupci membrán organelárních i buněčných – lysozomy uvolňují své enzymy a dochází k autolýze buňky. Influx Ca^{2+} z extracelulární tekutiny poškozenou buněčnou membránou a uvolnění z intracelulárních depo (ER) vede k celé řadě negativních jevů, především k nekontrolované aktivaci neutrálních proteáz (kalpainy - kalcium aktivované neutrální proteázy), fosfolipáz (atakujících membrány), endonukleáz, ke konverzi xanthin dehydrogenázy (NAD dependentní) na xanthin oxidázu vedoucí ke vzniku volných radikálů a k aktivaci NO syntázy. Zvýšeně produkovaný NO reaguje se superoxidem za vzniku peroxynitritu, který se rozkládá na nejreaktivnější hydroxylový radikál. Výsledkem je narušení a rozpad podstatné části biologicky důležitých komponent buňky. Jako reakce na tyto změny se v okolí odumírající buňky vyvíjí zánětlivá reakce. Pod vlivem chemotaxe vystupují z okolních cév polymorfonukleáry a makrocyty, ze kterých se uvolňují další enzymy, jež působí heterolýzu nekrotických buněk (Rock a Kono 2008). Z desintegrující se buňky, díky narušené bariérové funkci buněčné membrány, se uvolňují solubilní komponenty z buněčných organel nebo z cytosolu, které lze prokázat biochemicky v séru: transaminázy z hepatocytů; ze svalové tkáně isoenzym kreatinfosfokinázy a myoglobin; z kardiomyocytů kardiální isoenzymy laktát dehydrogenázy, kreatin fosfokinázy, myoglobinu, zejména však kardiální varianty troponinu.

3.2.1. Troponin

Troponin je bílkovina, která se vyskytuje v kosterní a srdeční svalovině. Je nezbytná pro mechanismus svalové kontrakce. Rozlišujeme tři subjednotky troponinu (troponin C, troponin I, and troponin T). Tyto jednotky tvoří proteinový komplex připojující se k proteinu tropomyosinu, který leží uvnitř žlábků mezi aktinovými vlákny ve svalové tkáni. Troponin T se váže k molekule tropomyosinu, troponin C váže kalciové ionty, bez kterých by kontrakce

neprobíhala a troponin I inhibuje (znemožňuje) vazbu aktinu s myosinem. V relaxovaném svalu tedy troponin-tropomyosinový komplex blokuje na aktinu vazebné místo pro připojení myosinu a zabraňuje tak kontrakci. Když je svalová buňka stimulována ke kontrakci akčním potenciálem, v sarkoplazmatické membráně i v ER se otevřou vápníkové kanály a uvolní se Ca^{2+} do sarkoplazmy. Některé z těchto vápníkových iontů se připojí k troponinu C, což způsobí konformační změnu tvaru a vystaví se vazebná místa pro myosin (aktivní místa) na aktinových vláknech. Vazbou aktinu na myozin za účasti ATP je následně zprostředkována svalová kontrakce. Kardiální izoformy troponinu T a I (cTnT a cTnI) jsou pro myokard specifické. Většina cTnT a cTnI je obsažena v kontraktlním aparátu (myofibrilách) myocytu, pouze 6–8 % cTnT tvoří nevázanou cytosolovou složku. V krvi se troponin cTnT normálně nevyskytuje. Po poškození kardiomyocytu, změnou propustnosti buněčné membrány (sarkolemy), je uvolňován do krve v důsledku proteolytické degradace proteázami. Průběh uvolňování cTnT je bifázický. Zvýšení troponinu po začátku infarktu (akutního infarktu myokardu) nastupuje v průběhu 3–8 hodin a prvního vrcholu je dosaženo za 12–18 hodin po poškození myokardu. Je vyvoláno rychlým uvolněním volné cytoplazmatické frakce cTnT. Počáteční vrchol je sledován dalším vrcholem za 3–4 dny, který odpovídá pomalejšímu vyplavování cTnT vázaného v troponin-tropomyosinovém komplexu v nekrotickém ložisku. Během 7–10 dnů klesá na nedetekovatelné hladiny (Xu a spol. 2013).

3.3. Apoptóza

Apoptóza je energeticky dependentní proces patřící mezi hlavní typy programované buněčné smrti. Je to fyziologický mechanismus, nevyvolávající zánětlivou reakci, který hraje významnou roli v udržování tkáňové homeostázy organismů. Základní principy apoptózy byly popsány již v devatenáctém století, nicméně slovo apoptóza použili poprvé v roce 1972 australský patolog John F. R. Kerr a jeho kolegové (Kerr a spol. 1972). Samotné slovo má původ v řečtině (*apoptosis – padání*) a bylo inspirováno podzimním opadáváním listů způsobené apoptózou (Fadeel a Orrenius 2005). Tento proces je obecně charakterizován zřetelnými morfologickými znaky a biochemickými mechanismy závislými na energii. Patří mezi ně aktivace specifických proteáz - kaspáz, expozice fosfatidylserinu na extracelulární povrch plazmatické membrány (Brouckaert a spol. 2004), narušení mitochondriálního membránového potenciálu, poruchy permeability mitochondriální membrány. Morfologickými znaky jsou smršťování buněk, vytváření vezikul obsahující intracelulární

matrix (apoptotických tělísek), degradace cytoskeletu a následná změna tvaru cytoplazmatické membrány (blebbing), či degradace jaderné DNA (na rozdíl od nekrózy nenáhodná se stejně velkými fragmenty) spojená s kondenzací chromatinu a posléze rozpadem jádra (Susin a spol. 2000). Zbytky apoptotických buněk jsou odstraněny fagocytózou a na rozdíl od nekrózy tento proces probíhá bez zánětlivé reakce (tabulka č. 1).

Tabulka č. 1. Srovnání morfologických znaků apoptózy a nekrózy (Susan Elmore 2007).

Apoptóza	Nekróza
Jednotlivé buňky nebo malé shluky buněk	Často velké shluky buněk až celé tkáně
Smršťování buněk	Otok buněk
Pyknosis and karyorrhexis	Karyolysis, pyknosis, možná i karyorrhexe
Cytoplazmatická membrána intaktní	Narušení cytoplazmatické membrány
Zachování cytoplazmy v apoptotických těliscích	Uvolnění cytoplazmy do okolí
Bez přítomnosti zánětu	Zánět obvykle přítomen

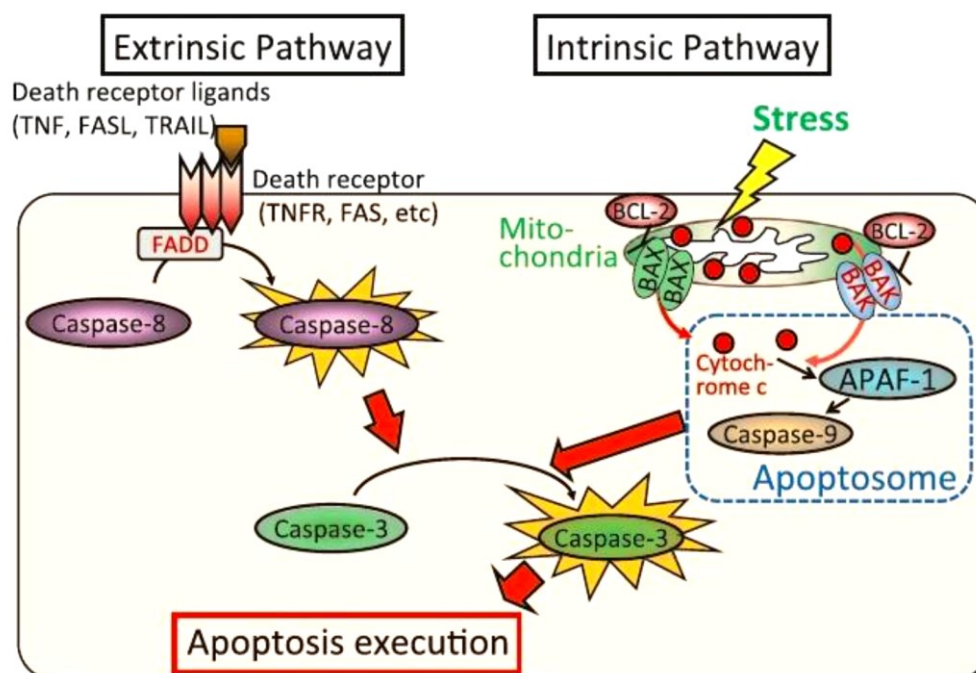
Apoptóza je považována za životně důležitou složku různých procesů např. přirozeného obratu buněk, správného rozvoje a fungování imunitního systému, hormonálně dependentní atrofie, embryonálního vývoje a chemicky indukované buněčné smrti. Nepřiměřená apoptóza (jak ve smyslu malého vyjádření, tak ve smyslu příliš velkého vyjádření) je odpovědná za různé patologické stavy jako neurodegenerativní onemocnění, ischemické poškození, autoimunitní poruchy a různé druhy nádorového bujení (Elmore 2007). Indukce apoptózy může být způsobena jak zevními signály (ionizující záření, hypertermie, toxické látky, působením steroidních hormonů, cytokinů, NO, imunitními pochody, virovými

infekcemi, či dokonce absencí stimulačního signálu), tak signály z buňky samotné, kdy dochází k takovému poškození jaderné DNA, které není buňka schopna opravit svými reparačními mechanismy. Dalším spouštěčem apoptózy může být například ztráta ukotvení buněk k extracelulární matrix. Pro tento pochod se používá termín „anoikis“, odvozený z řeckého výrazu pro „bezdomovectví“ a mající význam zejména u epitelových buněk (Liotta a Kohn 2004).

Vlastní průběh apoptózy využívá přísně regulované buněčné enzymatické kaskády. Tato regulace je geneticky řízena na několika úrovních, účastní se jí velký počet genů kodujících velké spektrum jak cytoplazmatických, tak membránových proteinů. V jejím průběhu existují body, ve kterých se mohou uplatnit různé kontrolní mechanismy. Mezi ně patří např. in/aktivace různých enzymů či míra exprese různých pro- a anti-apoptotických proteinů. Právě vzájemný poměr hladin pro a anti-apoptotických složek pak předurčuje definitivní osud buňky.

Apoptóza je iniciována dvěma hlavními signálními drahami, vnější a vnitřní (obrázek č. 3). Ačkoliv jsou obě odlišně iniciovány, v konečné fázi mají obdobné exekuční mechanismy.

Obrázek č. 3. Zevní a vnitřní dráha apoptózy (Tsuda a spol. 2012).



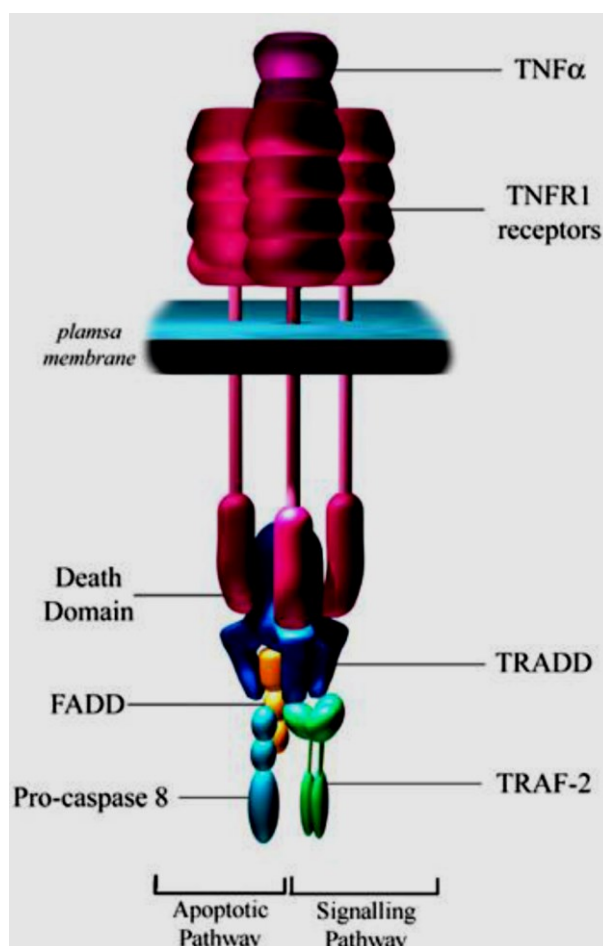
3.3.1. Vnější signální dráha apoptózy

Vnější apoptotická dráha zahrnuje interakce zprostředkované transmembránovým receptorem. Je indukována vazbou ligandů, např. TNF- α , TRAIL a FasL na odpovídající receptory (TNFR, FasR), které mají funkci buněčných senzorů. Po obdržení extracelulárního signálu (prostřednictvím navázání svých ligandů) vedou k rychlé iniciaci apoptózy. Tyto tzv. receptory smrti jsou členy super-rodiny genu pro receptor tumor nekrotizujícího faktoru (TNF, Locksley a spol. 2001). Členové rodiny TNF receptorů sdílí podobné extracelulární domény bohaté na aminokyselinu cytein a mají cytoplazmatickou doménu obsahující asi 80 aminokyselin nazývanou "doména smrti", která interaguje s adaptorovými proteiny viz obrázek č. 4 (Ashkenazi a Dixit 1998). Tato doména smrti hraje rozhodující roli při přenosu signálu z buněčného povrchu do intracelulárních signálních drah. Sekvence událostí, které definují vnější dráhu apoptózy, jsou nejlépe popsány pomocí signálních drah FasL / FasR a TNF- α / TNFR1. Po navázání ligandu na jeden z těchto receptorů dochází k připojení adaptorové molekuly: vazba ligandu Fas na Fas receptor má za následek vazbu adaptorového proteinu FADD a vazba TNF ligandu na receptor TNF vede k vazbě adaptorového proteinu TRADD a FADD (Hsu a spol. 1995, Wajant 2002). Spojení několika receptorů s adaptorovými proteiny indukuje, prostřednictvím dimerizace efektorové domény smrti (DED) adaptorového proteinu a DED prokaspázy, agregaci iniciačních prokaspáz, zejména prokaspázy-8. V tomto okamžiku vzniká signalizační komplex vyvolávající smrt buňky DISC (death-inducing signaling complex), který vede k autokatalytické aktivaci prokaspázy-8 (Kischkel a spol. 1995, Elmore 2007). Aktivované kaspázy se uvolňují z komplexu DISC do cytoplasmy ve formě heterotetrameru a aktivují efektorové kaspázy. Na rozdíl od efektorových kaspáz jako kaspáza-3 nebo kaspáza-7, které se v buňce vyskytují ve formě neaktivních dimerů a jsou aktivovány štěpením, jsou kaspáza-8 a další iniciační kaspázy (kaspáza-9, kaspáza-10) produkovány jako neaktivní monomery. K aktivaci kaspázy-8 je tedy nutná řetězová multimerizace v rámci komplexu DISC, dále vzájemným štěpením multimerů dochází k autoaktivaci s finálním vytvořením aktivního heterotetrameru (Dickens a spol. 2012).

Některé buněčné nebo virové proteiny, označované jako FLIP (FLICE inhibitory protein), mohou zahájení apoptózy prostřednictvím receptorů smrti blokovat. Tyto proteiny obsahují dvě efektorové domény smrti (DED) a strukturálně se většinou velmi podobají prokaspáze-8, přičemž ale postrádají enzymaticky aktivní místo (Krueger a spol. 2001). Z toho vyplývá, že pokud se proteiny FLIP naváží na adaptorový protein FADD, zabrání tak

navázání prokaspázy -8 a- 10 a tím i jejich aktivaci. Přesná funkce těchto proteinů zatím ještě není zcela objasněna, nicméně se předpokládá, že jsou součástí mnoha regulačních mechanismů buňky a hrají významnou roli v patogenezi nádorových onemocnění.

Obrázek č. 4. Receptor smrti.



Zdroj: <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/receptors.htm>

3.3.2. Vnitřní signální dráha apoptózy

Vnitřní signální dráha apoptózy zahrnuje různorodé stimuly, které bez účasti receptorů vyvolávají intracelulární signály úzce spojené s propustností vnější mitochondriální membrány, kdy je dominantní událostí volnění cytochromu-c, či přímým poškozením DNA. V případě poškození DNA a spuštění apoptózy hraje klíčovou roli gen p53 a jím kódovaný stejnojmenný protein.

Poškozením mitochondrií se buňka vlastně vzdává poslední šance na záchranu, protože tyto organely představují nezbytné biochemické děje buněčného dýchání. Podněty, jež iniciují vnitřní cestu, mohou působit buď pozitivně, nebo negativně. Pozitivně působí většinou stresové podněty, onkogeny, ultrafialové a γ -záření, poškozená DNA, hypoxie, hypertermie, virová infekce atd. Negativní signály zahrnují nepřítomnost určitých růstových faktorů, hormonů, cytokinů a mohou vést k selhání supresních programů buněčné smrti, a tím taktéž vyvolat apoptózu. Všechny tyto podněty v důsledku způsobují změny v mitochondriální membráně: vedou k otevření Bax/Bak kanálů v zevní mitochondriální membráně, ke ztrátě mitochondriálního transmembránového potenciálu a uvolnění proapoptotických proteinů z mitochondriálního mezimembránového prostoru do cytoplazmy (Saelens a spol. 2004).

První skupina proteinů uvolněných z takto poškozených mitochondrií se skládá z cytochromu-c, Smac / DIABLO a serinové proteázy HtrA2 / Omi (Garrido a spol. 2005). Cytochrom-c je za běžných podmínek lokalizován v mezimembránovém prostoru mitochondrií (Gross a spol. 1999). Během apoptózy se translokuje z mitochondrií do cytosolu, neboť jedině zde působí proapoptoticky. Uvolnění cytochromu c začíná tím, že se tento protein odpojí od vnitřní mitochondriální membrány (Gogvadze a spol. 2006), kde není vázán přímo, ale je k ní připojen prostřednictvím fosfolipidu cardiolipinu. Tato vazba je zprostředkována jednak tím, že za normálního fyziologického pH má cytochrom-c kladný náboj a tak se dobře váže se záporně nabitým cardiolipinem, jednak tím, že část fosfolipidu prochází hydrofobním kanálem, který je vytvořen v cytochromu-c (Ott a spol. 2007). Cytochrom-c je protein, který se normálně podílí na transportu elektronů při buněčném dýchání, v tomto případě však funguje jako další z řady aktivátorů apoptózy, protože se váže na cytosolový protein Apaf-1 (prostřednictvím jeho WD-40 repetice). Dále dochází ke konformačním změnám a hydrolýze k Apaf-1 vázaného ATP na ADP za vzniku heterodimeru Apaf-1-cytochrom-c, neboli apoptozomu. Centrální kruh apoptozomu tvoří sedm CARD a NOD domén s vyčnívajícími WD-40 repeticemi vážící cytochrom-c. Prokaspáza-9 se váže s CARD doménou a dimerizací dochází k její autoaktivaci. Aktivovaná kaspáza-9 štěpí a aktivuje kaspázu-3 viz obrázek č. 5 (Hill a spol. 2004, Ledgerwood a Morison 2009). Smac / DIABLO a HtrA2 / Omi podporují apoptózu vazbou na jejich inhibitory IAPs (inhibitory proteinů apoptózy). Tyto proteiny tedy aktivují kaspázově závislou mitochondriální dráhu. Sled událostí po uvolnění cytochromu-c a Smac je poměrně rychlý, indukují apoptotickou

buněčnou smrt a ztrátu integrity buněčné membrány během 4-24 hodin (Westphal a spol. 2011).

IAPs představují skupinu malých proteinů blokujících nástup apoptózy, zabraňují aktivaci prokaspáz. Mezi lidské IAPs patří XIAP, cIAP1 a cIAP2. XIAP (Xchromosome-linked inhibitor of apoptosis protein) je přímý inhibitor kaspázy-3 a kaspázy-9 (obrázek č. 10), zatímco cIAP1 a cIAP2 se podílejí na regulaci TNF receptorem zprostředkovaných signálních drahách (Guicciardi a spol. 2011). Ačkoli jsou nejvíce známy svojí schopností negativní regulace apoptózy, bylo v poslední době zjištěno, že se účastní kontroly ubikvitinem zprostředkovaných signálních drah ovlivňujících expresi genů důležitých pro zánět, imunitu, přežívání a migraci buněk. Na základě těchto poznatků je IAPs věnována pozornost na poli protinádorové terapie a jsou testovány umělé inhibitory IAPs označovány jako Smac-mimetics (Berthelet a Dubrez 2013).

Druhá skupina proapoptotických proteinů uvolňujících se z mitochondrií po stresovém stimulu jsou AIF, endonukleáza G a CAD (caspase-3 activated DNase). Uvolňují se z mitochondrií do cytosolu až po uvolnění cytochromu-c. AIF s endonukleázou G se přemísťují do jádra a způsobují fragmentaci DNA a kondenzaci periferního nukleárního chromatinu. Tato časná forma jaderné kondenzace je označována jako "stadium I". AIF s endonukleázou G fungují nezávisle na kaspázách. CAD je po uvolnění z mitochondrií taktéž translokován do jádra, kde po aktivaci kaspázou-3 vede k ještě výraznější a pokročilejší fragmentaci DNA, která je způsobena štěpením dvouvláknové molekuly DNA v internukleozomálních oblastech na dvouvláknové fragmenty o délce přibližně 185 párů bazí. Tato pozdější a výraznější kondenzace chromatinu se označuje jako "stadium II" (Susin a spol. 2000, Elmore 2007).

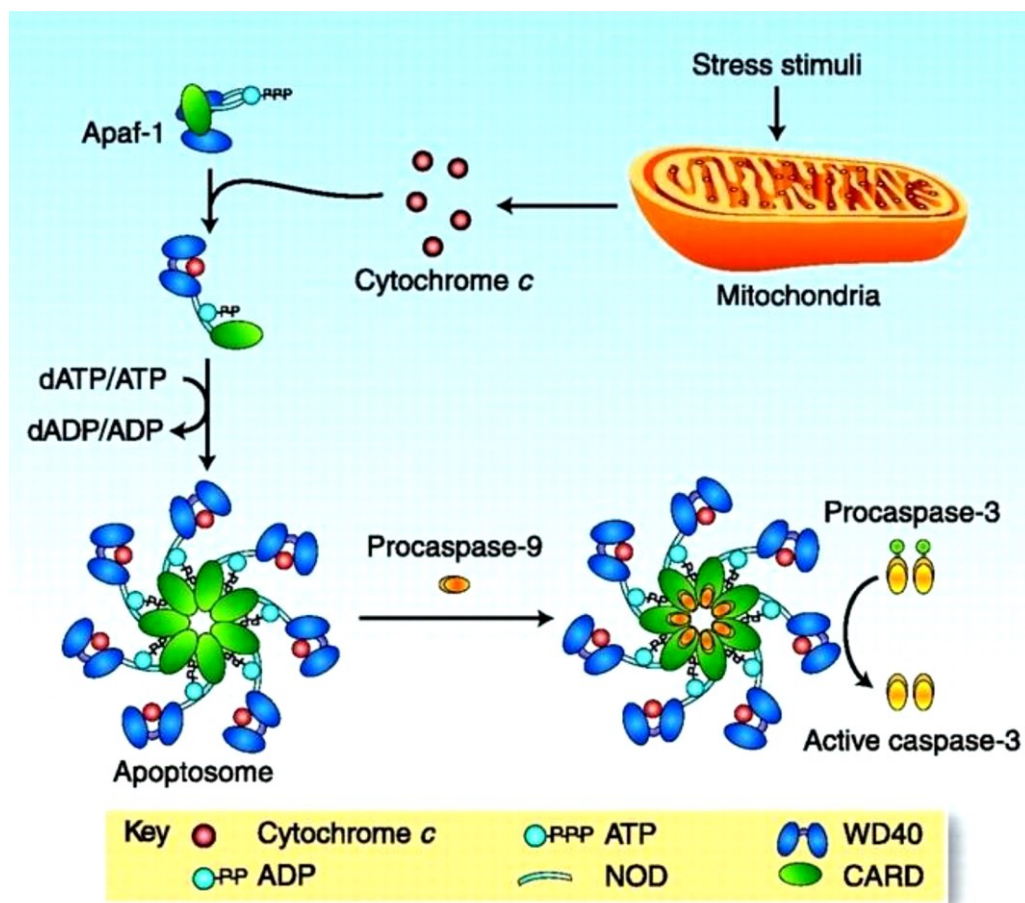
3.3.3. Aktivace efektorových kaspáz – konečná fáze apoptózy

Jak vnější, tak i vnitřní apoptotická dráha se spojují v tzv. exekuční fázi apoptózy, která je považována za konečnou fázi apoptózy. Během této části procesu dochází k aktivaci efektorových kaspáz (kaspáza-3, kaspáza-6 a kaspáza-7). Efektorové kaspázy se v buňce vyskytují jako neaktivní dimery a jsou aktivovány právě štěpením iniciačními kaspázami (kaspáza-8, kaspáza-9 a kaspáza-10).

Buňky podléhající apoptóze jsou nakonec odstraňovány fagocytozou apoptotických tělísek. Jejich identifikaci a včasné odstraňování fagocyty usnadňuje externalizace

fosfatidylserinu („eat me“ signál) na vnější stranu cytoplazmatické membrány apoptotických buněk. Tento proces včasného a účinného vychytávání bez uvolňování buněčných složek, které by mohly poškozovat okolní buňky, probíhá v zásadě bez zánětlivé reakce (Brouckaert a spol. 2004).

Obrázek č. 5. Vznik apoptozomu (Ledgerwood and Morison 2009).



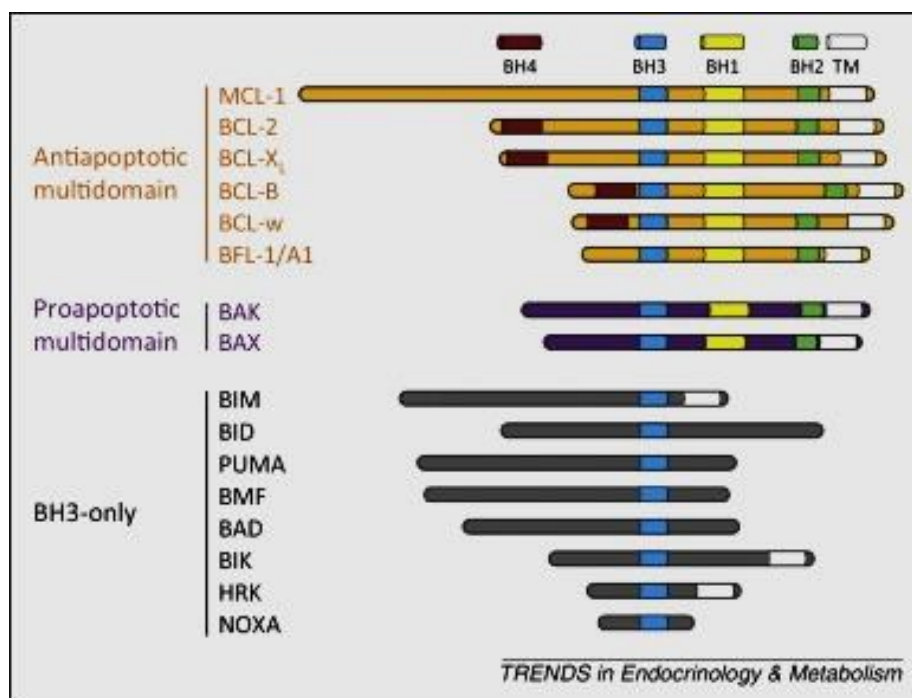
3.3.4. Kontrola a regulace apoptózy

3.3.4.1. Proteiny rodiny Bcl-2

Kontrola a regulace těchto apoptotických mitochondriálních dějů nastává prostřednictvím proteinů genové rodiny Bcl-2 (obrázek č. 6). Bcl-2 je genová rodina čítající více než 20 genů, jejíž název je odvozen od slov „B-cell lymphoma“, neboť byly poprvé

identifikovány v souvislosti s lymfomem B-buněk. Exprese těchto genů je pravděpodobně regulována proteinem p53. Všichni zástupci této rodiny obsahují ve svém kódu alespoň jednu ze čtyř evolučně konzervovaných BH-domén (označovaných BH1, BH2, BH3, BH4). Dále obsahují C-terminální hydrofobní úsek, který jim umožňuje umístění do membrán (vnější mitochondriální, jaderná, membrána endoplazmatického retikula). Proteiny Bcl-2 rodiny jsou schopné regulovat propustnost vnější mitochondriální membrány a mohou působit jak antiapoptoticky tak proapoptoticky. Proapoptotické proteiny Bcl-2 rodiny, které obsahují tři z BH-domén tzv. BH123 proteiny (např. Bax, Bak), obecně zvyšují propustnost mitochondriální membrány, což vede k vyloučení cytochromu-c z mitochondrie (signál pro provedení dalších kroků apoptózy). Skupinu proapoptotických proteinů obsahující pouze jednu BH3 doménu nazýváme BH3-only proteiny (např. Bim, Bid, Bad, Noxa, Puma). Naopak mezi antiapoptotické členy této rodiny patří vlastní protein Bcl-2 a jemu strukturně velmi příbuzné proteiny Bcl-x, Bcl-XL, Mcl-1 viz obrázek č. 6. Antiapoptotické proteiny mohou zabránit buněčné smrti vyvázáním nebo neutralizací BH123 proteinů. Jejich struktura vytváří tzv. hydrofobní „kapsičku“, která naváže BH3-doménu proapoptotických proteinů a tím je inaktivuje (Gimenez-Cassina a Danial 2015, Elmore 2007).

Obrázek č. 6. Proteiny genové rodiny Bcl-2 (Gimenez-Cassina a Danial 2015).



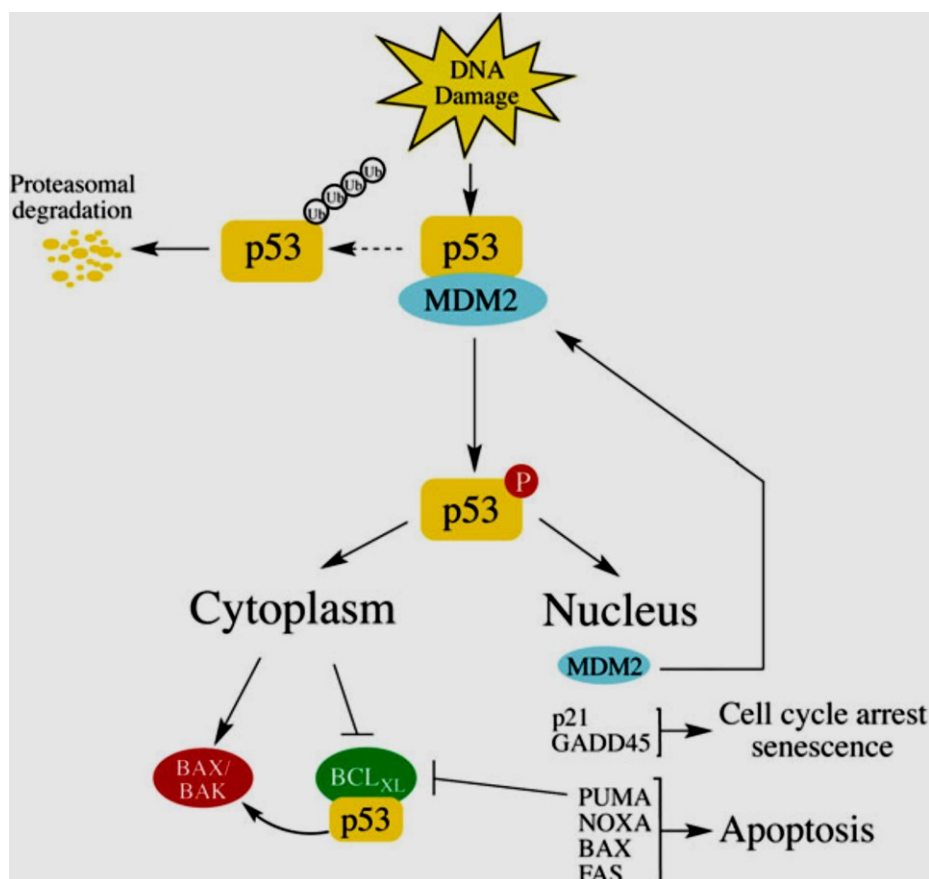
Jak bylo výše zmíněno, Bax a Bak jsou buněčným jádrem kódované proteiny (členové proteinové rodiny Bcl-2), vyskytující se ve zdravých buňkách ve formě monomerů. Stresové signály mění jejich konformaci, dochází ke shlukování do oligomerních komplexů a vytváření pórů ve vnější mitochondriální membráně tzv. Bax/Bak kanálů (Westphal a spol. 2011). Bax a Bak, ale i ostatní proapoptotické proteiny obsahující BH3-doménu, interagují s antiapoptotickými proteiny (např. Bcl-2), které otevření Bax/Bak kanálů blokují. Bax vytváří s Bcl-2 heterodimer s antiapoptotickým účinkem (Kuwana a spol. 2005). Při zvýšené expresi Bax však vznikají homodimery Bax/Bax, které naopak apoptózu usnadňují. Právě poměr Bcl-2 a Bax, někdy nazývaný „Bcl-2/Bax reostat“ je kontrolním bodem, po jehož překročení je již proces apoptózy ireversibilní. Rovněž může stresový signál způsobit, že se na tyto antiapoptotické proteiny (např. Bcl-2) naváží proapoptotické BH3-only proteiny (Bim, Bid, Bad, Puma), které je inhibují a tím umožní vznik Bax/Bax homodimerů, či multimerizaci Bax/Bak proteinů s vytvářením kanálů v mitochondriální membráně (Willis a spol. 2007). Některé BH3-only proteiny (Bim, Bid, Puma) mohou přímo interagovat s proteiny Bax či Bak (Kuwana a spol. 2005) a tak spoluaktivovat otevření těchto kanálů s uvolněním cytochromu-c. Puma BH3-only protein je taky důležitou součástí apoptotické signální dráhy kontrolované proteinem p53. V experimentu bylo prokázáno, že zvýšená exprese Puma proteinu byla provázena zvýšenou expresí Bax proteinu se zvýšeným vyplavováním cytochromu-c do cytosolu (Liu a spol. 2003).

3.3.4.2. Protein p53

Protein p53 je jaderný protein o velikosti 53 kD, patří mezi transkripční faktory a v buňce má funkci senzoru poškození DNA. Nazývá se „strážcem genomu“. Za fyziologického stavu je v cytoplazmě vázán na přenašeč MDM2, jeho hladina je udržována ubiquitin-proteazomovým systémem. Při poškození DNA se v buňce iniciují signální dráhy vedoucí k fosforylaci přenašeče MDM2, uvolnění proteinu p53 a jeho aktivaci. V jádře působí na gen p21, jehož proteinový produkt inhibuje cyklin-dependentní kinázu. Tímto způsobem dochází k zastavení buněčného cyklu v G1/S fázi a buňka si tak prodlouží čas potřebný k reparaci poškozené DNA. Proběhne-li úspěšná oprava DNA, může pokračovat buněčný cyklus dále (Taskiran a spol. 1997). Pokud poškození DNA přesahuje možnost reparace, zvýší se exprese proteinu p53 indukující syntézu proteinů navozujících apoptózu. Indukuje tak tvorbu proteinů Puma, Noxa a Bax, které zprostředkovávají odpověď buňky na genotoxické poškození.

Protein p53 taky transkripčně reguluje expresi dalších genů účastících se procesu apoptózy např. pro Apaf-1, Fas (Nakajima a Tanaka 2007). Kromě své transkripční aktivity může indukovat apoptózu nezávisle na transkripčních mechanismech viz obrázek č. 7. V cytoplazmě se analogicky jako BH3-only proteiny, ne zcela objasněným mechanismem, váže na antiapoptické Bcl-2, Bcl-XL a neutralizuje je sekvestrací, či přímo způsobuje multimerizaci Bax proteinů a vytváření pórů v zevní mitochondriální membráně (Baran a spol. 2013).

Obrázek č. 7. Regulace apoptózy proteinem p53 (Baran a spol. 2013).

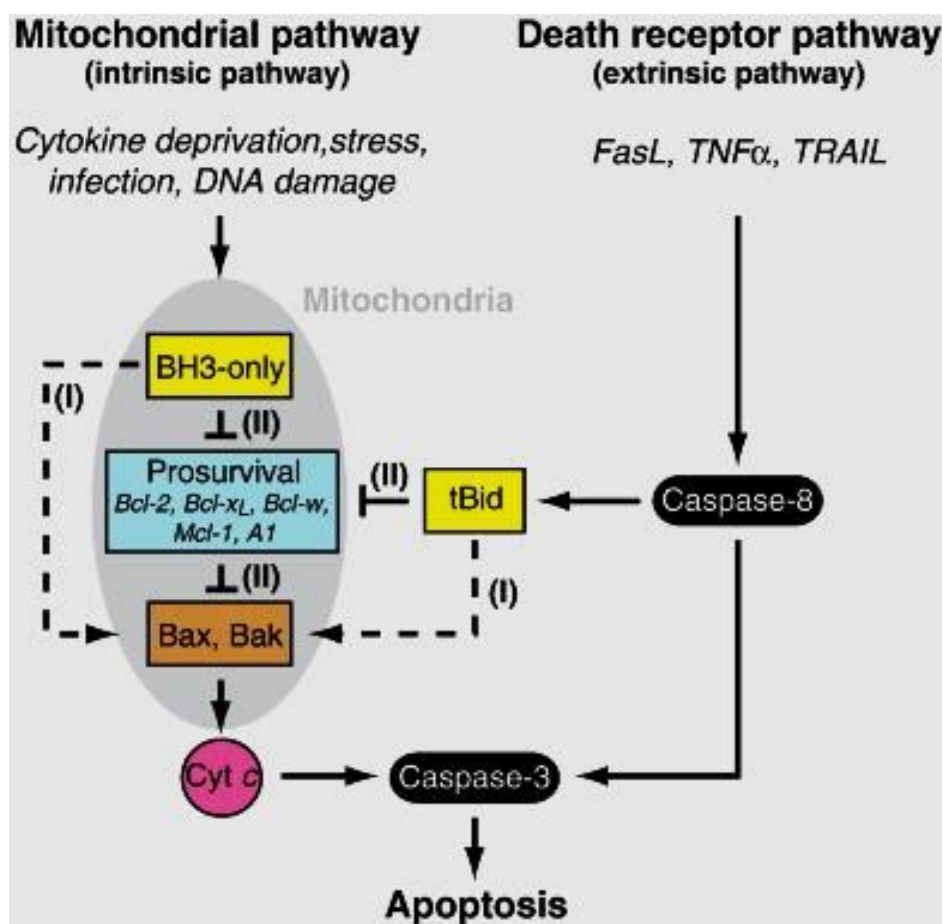


3.3.4.3. Vzájemné propojení obou apoptotických signálních drah

U některých buněk je ke spuštění apoptózy zapotřebí aktivace obou signálních drah zároveň. Pokud k plné apoptóze stačí pouze spuštění signální dráhy receptoru smrti (TNFR, FasR) s aktivací kaspázy-8 v DISC komplexu, označujeme tyto buňky jako I. typu. Buňky II.

typu potřebují ke spuštění plné apoptózy i signály z vnitřní mitochondriální dráhy, protože obsah FADD a kaspázy-8 v jejich DISC komplexech není dostatečný ke spuštění apoptózy. Množství kaspázy-8 však stačí k tomu, aby dokázala štěpit jeden z proapoptotických proteinů z rodiny Bcl-2, a to cytosolický protein Bid (BH-3 only). Kaspázou-8 rozštěpený Bid (tBid) putuje k mitochondrii, kde interaguje s dalšími proteiny Bcl-2 rodiny viz obrázek č. 8, čímž spouští procesy vedoucí k mitochondriální dysfunkci, uvolnění cytochromu-c do cytoplasmy a spuštění cesty mitochondriální smrti (Westphal a spol. 2011).

Obrázek č. 8. Propojení vnitřní a vnější signální dráhy apoptózy (Westphal a spol. 2011).



Z výše uvedeného vyplývá, že se obě apoptotické signální dráhy mohou v určitých bodech propojit. Příkladem dalších molekul, propojujících vnější i vnitřní apoptotickou signální dráhu, je protein Smac/DIABLO, který se uvolňuje po permeabilizaci mitochondriální membrány. Tento protein interaguje s proteinem XIAP (patří mezi IAPs -

inhibičních proteiny apoptózy) a sequestruje jej. Následkem toho XIAP nemůže inhibovat kaspázy-3 a -9, které tak podstoupí svou plnou proteolytickou aktivaci (obrázek č. 10). Kaspáza-3 pak kromě dalších proteinů štěpí i samotný XIAP, čímž usnadňuje apoptotickou zpětnou vazbu a celý systém funguje jako amplifikační smyčka (Jin a El-Deiry 2005). Dalším příkladem propojení může být vícečetná funkce proteinu p53, který v odpovědi na poškození DNA působí nejen prostřednictvím vnitřní signální dráhy přes proapoptotické molekuly jako Puma, Bax, Noxa, ale také upreguluje geny proteinů účastnících se vnější signální kaskády, např. geny pro FasL či TRAIL-R2 receptor smrti (Taskin a spol. 1997, Nakajima a Tanaka 2007).

3.3.4.4. Kaspázy

Kaspázy jsou skupinou proteáz s cysteinem v aktivním místě, které štěpí (hydrolyzují) peptidovou vazbu specificky za aspartátem (odtud anglický název cysteinyl aspartate specific protease). Kaspázy mají klíčový význam v celém procesu programované buněčné smrti a jejich aktivace spouští proteolytickou degradaci intracelulárních proteinů. Zahajují ireversibilní, neboli rozkladovou fázi apoptózy („point of no return“). U člověka je známo asi dvanáct kaspáz, z nichž se sedm vyskytuje v apoptotické kaskádě. Ostatní souvisí s průběhem buněčného cyklu, zánětem a dalšími buněčnými procesy (obrázek č. 9).

(i) Kaspázy účastnící se zánětlivé reakce, nikoliv apoptózy. Tato skupina zahrnuje kaspázy -1, -4, -5, -11, -12

(ii) Iniciační apoptotické kaspázy-8 a -9 normálně existují ve formě inaktivních monomerů – prokaspáz, které se skládají z velké podjednotky, malé podjednotky a N-terminální prodomény. Iniciační kaspázy jsou aktivovány dimerizací a nikoliv štěpením. Dimerizace usnadňuje autokatalytické štěpení kaspázových monomerů na jednu velkou a jednu malou podjednotku, což vede ke stabilizaci dimeru. Tato skupina kaspáz má na své N-terminální prodoméně, která je značně variabilní, umístěny buď dvě domény smrti DED (kaspázy-8 a -10) nebo tzv. doménu CARD (kaspázy-2 a -9) sloužící ke zprostředkování interakce kaspáz s různými adaptorovými molekulami.

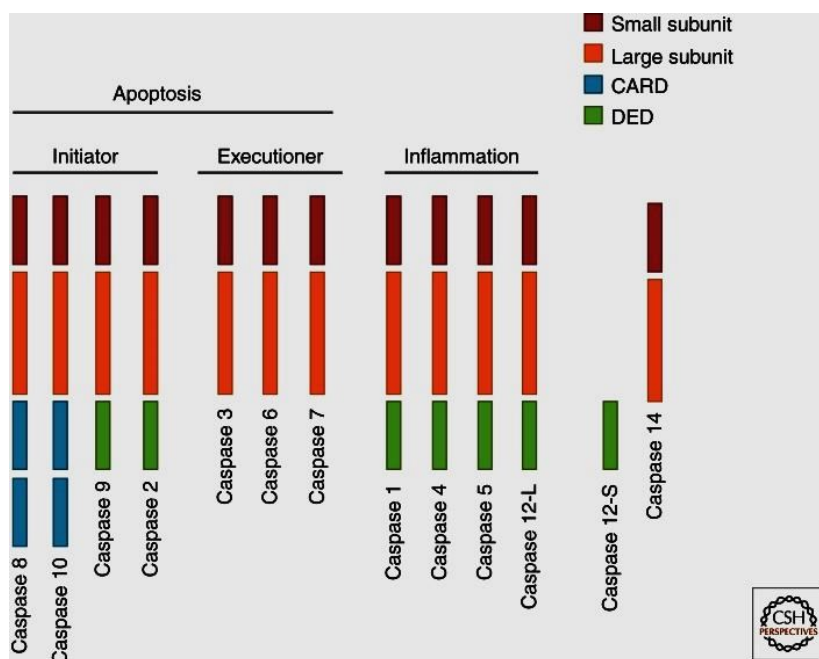
iii) Efektorové kaspázy apoptotické kaskády (kaspázy-3, -6 a -7) jsou exprimovány ve formě dimerů a jsou typicky aktivovány (štěpeny) iniciačními kaspázami. Toto štěpení mezi velkými a malými podjednotkami umožňuje konformační změnu, která spojuje obě aktivní místa dimeru kaspázy a vytváří funkčně zralou proteázu. Jakmile je efektorová kaspáza

aktivována, může rozštěpit a aktivovat další kaspázy, což vede k pozitivní zpětné vazbě aktivace kaspáz. Jako substrát jim slouží různé buněčné struktury jako aktiny (čímž mění cytoskelet), lamininy v jaderné membráně, proteiny související s regulací buněčného cyklu (např. cyklin A), proteiny účastníci se replikace DNA (např. topoizoméráza), transkripce (např. NF- κ B) a přenosu signálu (např. kináza C). Účastní se také degradace DNA, protože aktivují DNázu nazývanou CAD tak, že štěpí její vazbu s inhibitem ICAD. Kaspázy rovněž štěpením likvidují i některé antiapoptotické proteiny jako Bcl-2, Bcl-XL, IAPs. Nejvýznamnější efektorovou kaspázou je kaspáza-3 (McIlwain a spol. 2013).

3.3.4.4.1. Kaspáza-3

Kaspáza-3 je důležitou efektorovou kaspázou, která v průběhu apoptózy štěpí mnoho cytoplazmatických i jaderných proteinů a specificky aktivuje endonukleázu CAD (caspase activated DNase). Tento protein (enzym) je v normálně proliferujících buňkách v komplexu s jeho inhibitorem ICAD, nicméně v apoptotických buňkách aktivní kaspáza-3 štěpí ICAD a CAD pak degraduje chromozomální DNA uvnitř jádra a způsobuje typickou kondenzaci chromatinu. Kaspáza-3 také indukuje cytoskeletální reorganizaci a dezintegraci buněk do apoptotických tělísek.

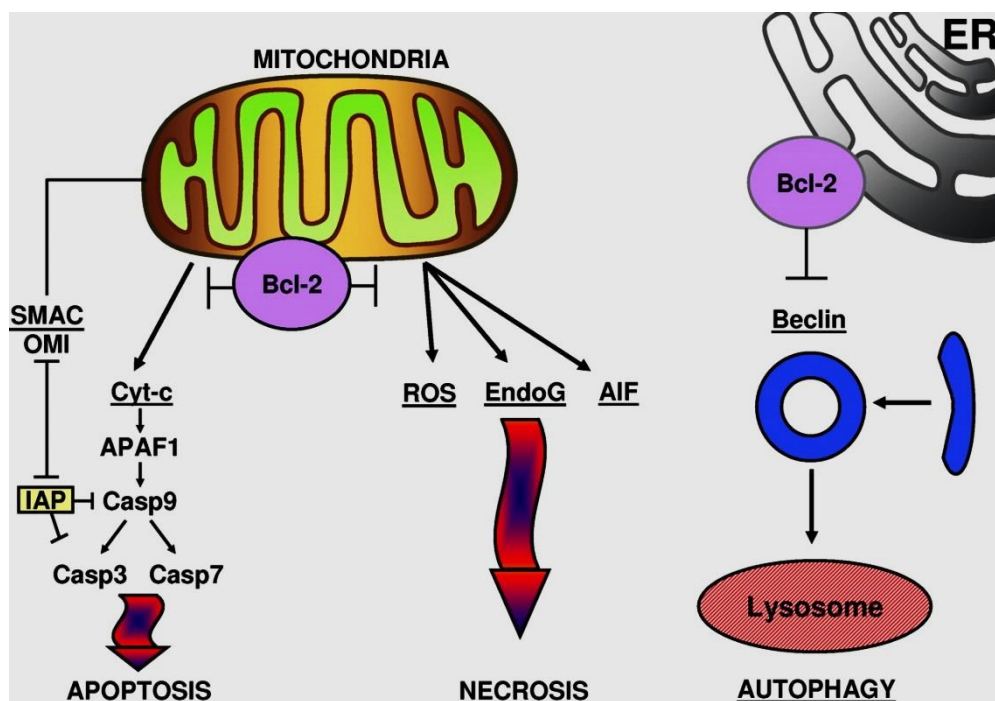
Obrázek č. 9. Struktura lidských kaspáz (McIlwain a spol. 2013).



3.3.4.5. Protein Bcl-2

Bcl-2 protein je antiapoptotický protein o velikosti 26 kD a skládající se z 8 α -helixů. Bcl-2 se nachází v membránách mitochondrií, v endoplazmatickém retikulu a v perinukleární membráně. Ve své struktuře na straně $\alpha 3$ helixu nese hydrofobní „kapsičku“, která se váže s BH-3 doménou proapoptických proteinů a inaktivuje je. Vzhledem k vyššímu počtu hydrofobních aminokyselin v této kapse je vazba proapoptických proteinů na Bcl-2 slabší než na Bcl-Xl (Petros a spol. 2004). Komplexy formuje, podobně jako Bcl-Xl, zejména s proteiny Bak či Bad a brání jejich oligomerizaci a tím tvorbě pórů v zevní mitochondriální membráně. Dále je funkce Bcl-2 pravděpodobně spjata s regulací hladiny Ca^{2+} v endoplazmatickém retikulu a mitochondriích. Zda Bcl-2 zvyšuje, či snižuje hladinu Ca^{2+} v ER není ještě zcela objasněno. Nicméně se obecně předpokládá, že redukuje nadměrné uvolnění vápníkových iontů do cytosolu po stimulech indukujících apoptózu. Bcl-2 také může tvořit shluky v prostoru mezi vnitřní a vnější mitochondriální membránou a podílet se na vzniku mPTP póru, který může sloužit jako vápníkový kanál (Chiu 2018). Napomáhá tedy k udržování buněčné homeostázy a vyvažuje interakce mezi jednotlivými členy Bcl-2 rodiny (obrázek č. 10).

Obrázek č. 10. Bcl-2 proteinem zprostředkovaná inhibice apoptozy, nekrózy, autofagie (John C. Reed 2008). ROS – kyslíkové radikály, Cyt-c - cytochrome-c, EndoG - endonuclease G, AIF- apoptózu-indukující factor, IAP - inhibitor apoptických proteinů.



3.4. Pohlavní rozdíly

Otázka pohlavních rozdílů se stala v poslední době populárním tématem. Důvodem tohoto zájmu je rostoucí počet publikovaných výzkumných studií, zabývajících se danou problematikou. Tím zároveň roste množství důkazů o odlišném chování mužského a ženského srdce jak za fyziologických, tak i patologických podmínek. Další možnou příčinou zvýšeného zájmu mohou být také kontroverzní zkušenosti s hormonální substituční terapií u žen během menopauzy.

Nyní je již poměrně dobře známo, že pohlaví ovlivňuje řadu onemocnění. Ženy jsou ve srovnání s muži více ohroženy např. depresemi, osteoporózou, astmatem, kuřáckým karcinomem plic a autoimunními chorobami (Leinwand 2003). Dále je u žen častější výskyt některých autoimunitních chorob, např. systémový lupus erytematodes nebo Sjogrenův syndrom je ve věkové skupině 15-40 let až 10krát častější u žen. U žen je rovněž vyšší výskyt chorob pojivové tkáně a nemocí, jejichž podkladem je abnormální reaktivita cév, jako jsou například migrény nebo Raynaudův syndrom; častější jsou u žen i vaskulitidy (Mathur a spol. 2015). Z mnohých klinických i experimentálních pozorování vyplývá, že kardiovaskulární aparát je systémem, kde se pohlavní dimorfismus uplatňuje výraznou měrou (Regitz-Zagrosek 2006). Obecně je mužská populace ve stejné věkové kategorii více ohrožena než populace ženská před nástupem menopauzy. Toto srovnání se netýká pouze ischemické choroby srdeční, hlavní příčiny úmrtnosti mužů i žen v rozvinutých zemích, ale platí i u jiných kardiovaskulárních onemocnění jako jsou arteriální hypertenze, arytmie a srdeční selhání. Po menopauze se však výskyt kardiovaskulárních onemocnění zvyšuje také u žen. Nejprve se usuzovalo, že tato zvýšená incidence souvisí pouze s klesající celkovou hladinou estrogenů během menopauzy. Na základě těchto předpokladů se substituční hormonální terapie stala oblíbeným výzkumným tématem, které přineslo zjištění, že pouhé nahrazení hormonů u postmenopauzálních žen nesníží výskyt ischemické choroby srdeční, ale může ji dokonce i zvýšit (Hulley a spol. 1998, Rossouw a spol. 2002, Regitz-Zagrosek 2006). Částečně se nedostatečná ochrana náhradními hormony přisuzovala rozdílným farmakologickým vlastnostem použitých preparátů v kombinaci s možným pozdním nástupem substituční terapie (Ouyang a spol. 2006). Nicméně publikované práce současně zvýraznily, že jde o proces mnohem složitější a komplexnější, na němž se pravděpodobně podílí genetické informace pohlavních chromozomů, hormonální status jedince a jejich vzájemná interakce (Miller 2010). Dále je třeba vzít v úvahu, že kardiovaskulární systém není ovlivněn pouze

estrogeny, ale také na něj více či méně působí i jiné pohlavními steroidy, jako jsou progesteron a androgeny (Kolář a Ošťádal 2013). Navíc se jejich účinky liší v různých obdobích ontogenetického vývoje jedince a u samic také ještě během menstruačního cyklu. Ačkoli není role pohlavních hormonů zdaleka jednoznačně vysvětlena, velké množství důkazů přece jenom naznačuje, že estrogen je hlavním hráčem, jenž určuje pohlavní rozlišnosti v kardiovaskulárním systému. Ovlivňuje funkce cév, zánětlivé reakce, metabolismus, senzitivitu tkání k inzulinu, přežívání myocytárních kmenových buněk, rozvoj srdeční hypertrofie atd. (Murphy a Steenbergen 2014).

3.4.1. Pohlavní rozdíly v kardiovaskulárním systému za fyziologických podmínek

Pohlavní odlišnosti v kardiovaskulárním systému jsou patrné již u normálních jedinců za fyziologických podmínek. Na počátku minulého století Bazett a kol. (1920) publikoval práci, v níž pozoroval vyšší klidovou srdeční frekvenci u žen než mužů. Délka sinusového cyklu u žen je kratší než u mužů; během menstruace se prodlužuje (Burke a spol. 1997). Ženy mají ve srovnání s muži delší trvání akčního potenciálu a vzhledem k tepové frekvenci delší korigovaný QT interval (Stramba-Badiale a spol. 1997). Tento rozdíl se objevuje začátkem puberty a je přisuzován relativnímu zkrácení QTc intervalu u mužů (Rautaharju a spol. 1992). Při stejné tepové frekvenci je i nekorigovaný QT interval delší u žen než u mužů (Smetana a spol. 2004, Rautaharju a spol. 2014). Zotavovací čas sinusového uzlu je u žen naopak kratší než u mužů (Burke a spol. 1997). Další velké populační studie ukázaly, že průměrná srdeční frekvence u žen je o 3-5 tepů za minutu rychlejší než u mužů a krevní tlak je do menopauzy taky nižší o 6-7 mmHg (Liu a spol. 1999, Dubey a spol. 2002). S dřívějším výskytem a závažností hypertenze u mužů je spojován Sry gen na Y chromozómu (Turner a spol., 2009). Je to gen, který iniciuje vývoj varlat, ale zároveň jeho produkt, jako transkripční faktor, může ovlivňovat aktivitu tyrosinhydroxylázy, enzymu potřebného pro konverzi tyrosinu na dihydroxyfenylalanin (DOPA). To je hlavní cesta syntézy norepinefrinu, primárního neurotransmiteru sympatického nervového systému. Z uvedeného lze tedy předpokládat, že aktivace sympatického systému u mužů se liší od aktivace sympatiku u žen (Miller 2010). Rozvoj echokardiografie přinesl důkazy o horších diastolických parametrech a větším poklesu systolické funkce srdce u mužů vlivem stárnutí (Grandi a spol. 1992). Dále můžeme odlišnosti pozorovat např. v hmotnosti srdce, která se v dětství u chlapců a děvčat prakticky neliší. Nástupem puberty s výrazným vlivem pohlavních hormonů však dochází v dalším

vývoji k významnému nárůstu absolutní i relativní hmotnosti srdce u mužů, rozdíl může dosáhnout 15-30%. Stárnutím se však relativní hmotnost srdce u mužů opět snižuje, zatímco u žen zůstává konstantní (Olivetti a spol. 1995). Podobně je tomu i u zvířat, kdy na opičím modelu bylo prokázáno, že hmotnostní poměr pravé i levé komory k váze těla se u samců s rostoucím věkem snižuje, zatímco u samic tento poměr zůstává takřka konstantní (Zhang a spol. 2007). Zmíněná pozorování souvisí i s počtem srdečních buněk. Startovní počet kardiomyocytů se u obou pohlaví neliší. Avšak zatímco u žen se počet myocytů prakticky nemění, u mužů naopak dochází mezi 17. a 89. rokem života k úbytku myocytů o 45 milionů/rok u levé komory a 19 milionů/rok u komory pravé (Olivetti a spol., 1995). Zde se nesporně uplatňuje i odlišnost v přítomnosti apoptózy. Zkoumáním výskytu apoptózy v normálních lidských srdcích mezi 21. a 93. rokem věku bylo zjištěno, že přítomnost tohoto typu buněčné smrti byla v mužských srdcích třikrát vyšší než v srdcích žen, přičemž věk tento rozdíl neovlivnil (Mallat a spol. 2001). Rovněž byl zjištěn významný rozdíl ve výskytu apoptózy ve stěně věnčitých tepen, u mužů byl vyšší než u žen (Boddaert a spol. 2005). Ztráta buněčné tkáně je u mužů kompenzována zvětšováním přežívajících myocytů, což znamená, že hypertofický růst je u nich podstatně vyšší. Tuto představu rovněž podporuje pozorování Zhanga a spol. (2007), který na příčných řezech myocytů různě starých opic zjistil, že zatímco u samců dochází ke zvětšení o 51 %, pak u samic je tento růst pouze 8 %.

Studie popisující kontraktilní funkce srdečního svalu v experimentu jsou poněkud rozporuplné. Capasso a spol. (1983) testovali kontraktilitu papilárního svalu 6 měsíců starých potkanů. U samičího svalu zaznamenali významně vyšší rychlost kontrakce a relaxace ve srovnání se samci. Naopak Schaible a Scheuer (1984) na izolovaném pracujícím srdci laboratorního potkana pozorovali vyšší bazální kontraktilní funkci u samců. Leblanc a spol. (1998), kteří k experimentu použili papilární sval potkanů mladších 6 měsíců, žádný pohlavní rozdíl v kontraktilní funkci nenalezli. Příčinou rozdílných výsledků jsou nejspíše odlišnosti v experimentálních postupech.

Pohlavní rozdíly jsou však zřetelné nejen ve velikosti srdce a buněčné struktuře, pozorujeme je také na subcelulární úrovni: větší počet vápníkových kanálů L-typu, proteinů $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměníku v cytoplazmatické membráně a vápníkových kanálů (ryanodinových receptorů) v sarkoplazmatickém retikulu u zvířecích samic (March a spol. 1998, Chu a spol. 2005). Zvýšená exprese těchto proteinů, které se zásadním způsobem podílejí na řízení koncentrace vápníku v myocytech, byla vždy doprovázena vyšší hladinou mRNA, což nasvědčuje tomu, že jejich regulace se děje na transkripční úrovni. Za povšimnutí stojí, že

významný rozdíl v expresi uvedených klíčových proteinů byl provázen pouze malým rozdílem v kontraktilní funkci, z čehož vyplývá, že množství bílkovin v podstatě nic neříká o funkční aktivitě těchto regulačních systémů (Ošťádal a spol. 2009).

Odlišné chování samičích a samčích srdcí související s metabolismem vápníku popisuje i Wagner a spol. (2011), kdy 24 hodinová inkubace s testosteronem nebo 17 β -estradiolem zvýšila tok Ca^{2+} přes L-typ vápníkových kanálů v komorových myocytech krys, avšak účinek testosteronu byl přítomen pouze v buňkách izolovaných od samic, zatímco účinek 17 β -estradiol byl přítomen pouze u myocytů od samců. Zdá se tedy, že tok Ca^{2+} přes zmíněný typ kanálů je již maximálně stimulován příslušným pohlavním hormonem přítomným *in vivo*, což činí buňky necitlivé na stejný hormon *in vitro*. Jedno z možných vysvětlení, proč samičí myokard trpí méně ischemicko-reperfúzním poškozením, nabízí experimentální pozorování u krys, které popisuje menší vychytávání Ca^{2+} mitochondriemi samičích srdcí a tím lepší udržováním mitochondriálního membránového potenciálu při vyšších hladinách Ca^{2+} . Taktéž samice potkanů generovaly méně kyslíkových radikálů (Arieli a spol. 2004, Colom a spol. 2007). Tato fakta můžou mít dopad na odlišný průběh oxidačního stresu při reperfuzi u obou pohlaví, můžou rovněž přispět k vysvětlení rozdílné odpovědi samčího a samičího myokardu na nedostatek kyslíku a taktéž by mohla pomoci lépe porozumět principům, proč je u žen nižší výskyt onemocnění souvisejících se stárnutím.

Na druhou stranu se v samčích myocytech pozorovala vyšší hustota beta- adrenergních receptorů a tím také zvýšená vnímavost k beta-adrenergní stimulaci, která je provázena větším průnikem kalcia do buňky s možným ohrožením myocytu kalciovým přetížením (Ošťádal a spol. 2009, Kolář a Ošťádal 2013).

3.4.2. Pohlavní rozdíly v kardiovaskulárním systému za patologických podmínek

Jestliže existují pohlavní rozdíly srdečního svalu za fyziologických podmínek, můžeme předpokládat, že se kardiovaskulární systém mužů a žen liší i za podmínek patologických, tedy po vystavení srdce např. infarktu myokardu, tlakovému či objemovému přetížení. Ošťádal a spol. (1984) již v osmdesátých letech zveřejnili práci, v níž pozorovali u krys větší odolnost samičího myokardu pravé komory srdeční ke kyslíkové depleci. Lagranha a kol. (2010) jasně ukázali, že estrogen snižuje uvolňování kyslíkových radikálů z mitochondrií po ischemickém inzultu a tím zvyšuje toleranci samičích srdcí k ischemicko-

reperfuznímu poškození. Sklon k výraznější systolické dysfunkci myokardu u samců po ischemickém infarktu s kardioprotektivním vlivem estrogenů popisuje i Fukumoto a spol. (2012). McKee a spol. (2013) zkoumali možný mechanismus progresu hypertrofické kardiomyopatie v souvislosti s pohlavím. Pozorovali pohlavní rozdíly ve fosforylaci kardiomyofibrilárního troponinu I. Odlišnosti v posttranslačních modifikacích kontraktilních proteinů mohou souviset s estrogenem zprostředkovanými signálními drahami a mohly by přispět k vysvětlení pohlavních rozdílů ve svalové činnosti.

Ciocchi Pardo a spol. (2018) popisují na potkaním modelu, po vystavení ischemicko-reperfuznímu poškození, menší velikost infarktové plochy a lepší poischemické zotavení myokardu u samičích srdcí. Pohlavní odlišnost pozorovali i u ischemického post-conditioningu (vystavení myokardu třem cyklům opětovné 30 sekundové ischemie během reperfuze), který u samic vedl k nižší produkci kyslíkových radikálů i menší detekci apoptózy a u samců došlo k zlepšení poischemické funkce myokardu.

Z výsledků epidemiologických studií je zřejmé, že nástup ischemické choroby srdeční je u žen přibližně o 10 let zpožděn proti mužské populaci. U infarktu myokardu je tento rozdíl ještě větší (Vaccarino a spol. 1995). Během menopauzy jsou ženy proti infarktu myokardu relativně chráněny (Rich-Edwards a spol. 1995). Avšak po menopauze dochází u žen k aceleraci výskytu ICHS, tento rozdíl je více než 10krát větší oproti fertilnímu období. Dokonce je incidence ICHS v tomto období téměř dvakrát vyšší u žen než u mužů (Duell 2003). Možnou příčinou jsou pravděpodobně pohlavní rozdíly v rozvoji aterosklerotických změn v průběhu života (Fejfar 1975). Tento předpoklad podporují i nálezy nižších plazmatických hladin lipoproteinů LDL a naopak vyšších hodnot HDL u premenopauzálních žen (Ošťádal a spol. 2009). V experimentu vedla dieta s vysokým obsahem tuků u samců křečků k častějšímu a rychlejšímu rozvoji aterosklerotických změn než u samic (Wilson a spol. 1999). U králíků byly pozorovány obdobné rozdíly (Hayashi a spol. 1995). Při podávání stravy s vysokým obsahem cholesterolu došlo k výraznějšímu rozvoji aterosklerotického poškození u samců. Stojí za zmínku, že během shodné diety byla u samic, kromě odlišného lipidového spektra, zjištěna rovněž vyšší hladina oxidu dusnatého v endotelu cév. Je tedy pravděpodobné, že se odlišný metabolismus NO může podílet na pohlavních rozdílech v patogenezi aterosklerózy.

U člověka byla popsána rozdílná distribuce aterosklerotických změn v různých oblastech arteriálního systému mužů a žen (Mathur a spol. 2015). Významné pohlavní rozdíly

v rozsahu a stupni aterosklerotického poškození v koronárním řečišti popsali Kardys a spol. (2007). Naopak v aortě a tepnách dolních končetin autoři nepozorovali výrazné pohlavní rozdíly. Co se týká morfologie aterosklerotických plátů, tak Yahagi a spol. (2015) zjistili, že aterosklerotické pláty v koronárním řečišti mužů jsou větší než u žen; pláty u mužů jsou více excentrické ve srovnání s pláty u žen (Han a spol. 2008). U mužů je rovněž popisováno častější krvácení do aterosklerotických plátů s tvorbou ulcerací (Sangiorgi a spol. 2015). U žen je naopak častější výskyt stabilních kalcifikovaných plátů, s menší infiltrací zánětlivými buňkami, včetně přítomnosti menšího počtu pěnových buněk uvnitř plátů. Tato relativně příznivější morfologie plátů souvisí s věkem a u starších žen dochází ke ztenčení fibrózní vrstvy stabilního plátu a nárůstu objemu nekrotického jádra, což přispívá k nestabilitě plátu. Může to být jedno z možných vysvětlení zvýšeného výskytu koronárních příhod u žen staršího věku (Yahagi a spol. 2015).

Zjištěny byly i rozdíly v reaktivitě cév. U žen je častěji přítomna hyperreaktivita cév, mající za následek vaskulární spasmy v koronární mikrocirkulaci a klinicky se manifestuje jako vazospastická angina pectoris (Reis a spol. 2001, Sun a spol. 2002). Tato neokluzivní forma anginy pectoris se dokonce zvyrazňuje po menopauze (Kaski 2006). Porucha funkce NO-dependentního vazodilatačního mechanismu je pravděpodobně příčinou této hyperreaktivit (Mohri a spol. 1998, Han a spol. 2008).

S nástupem puberty se objevují pohlavní rozdíly v hodnotách krevního tlaku a ve stejnou dobu se začíná lišit i prevalence hypertenze. U žen před menopauzou je nižší výskyt hypertenze ve srovnání se stejně starými muži (Himmelman a spol. 1994, Dubey a spol. 2002); po menopauze tato difference mizí a u žen starších 65let je incidence hypertenze dokonce vyšší než u mužů (Roger a spol. 2011). Jednoznačné vysvětlení uvedeného jevu zatím neznáme, příčina je pravděpodobně multifaktoriální. Pokusy ovlivnit hypertenzi pomocí hormonální substituční terapie nevedly k výraznějšímu poklesu krevního tlaku, takže snížená hladina estrogenů není jedinou příčinou zvýšeného krevního tlaku po menopauze (Reckelhoff 2001). Předpokládá se, že tady hraje důležitou roli kombinace různých faktorů jako odlišná aktivita renin-angiotensinového systému (Schunkert a spol. 1997), snížení tělesné aktivity s nárůstem hmotnosti, zvýšená hladina endotelinu u postmenopauzálních žen, či snížená exprese estrogenních receptorů v kardiovaskulárním systému vlivem stárnutí (Nuzzo a spol. 2010, Di Giosia a spol. 2018)

Byly popsány rovněž pohlavní rozdíly v charakteru hypertrofie levé komory jako reakci na zvýšený afterload u stenózy aortální chlopně a u systémové hypertenze. Buttrick a Scheuer (1992) pozorovali, že stejný stupeň aortální stenózy je lépe tolerován u žen, a že u žen taky bývá častěji zachována dobrá funkce levé komory. V souladu s těmito výsledky Villari a spol. v roce 1995 publikovali práci, ve které při srovnatelném postižení aortální chlopně pozorovali u žen menší end-systolické i end-diastolické objemy levé komory srdeční a rovněž lepší ejekční frakci s lepší poddajností myokardu oproti mužům. Pohlavní dimorfismus se tedy projevuje rychlostí změn, stupněm hypertrofie, remodelací srdečních komor i rozsahem fibrotizace.

Co se týká zániku srdečních buněk, jsou pohlavní rozdíly i v mechanismu buněčné smrti; Guerra a spol. (1999) prokázali, že nekróza a apoptóza je v mužském selhávajícím myokardu 2x větší než v myokardu ženském. Obecně lze říci, že se samičí myokard vyrovnává se zátěží lépe.

3.4.3. Apoptóza v myokardu

Apoptóza byla podrobně probrána v kapitole 3.3. Jedná se tedy o energeticky dependentní programovanou smrt buňky, která je přítomná v průběhu života ve všech orgánech. V srdci je přítomná jednak za fyziologických podmínek v průběhu stárnutí myokardu (Mallat a spol. 2001), jednak za patofyziologických podmínek jako je ischemie myokardu, srdeční selhání nebo rejekce u transplantovaného srdce (Chen a spol. 2002, Veinot a spol. 1997). Narula a spol. v roce 1996 popsal výskyt apoptózy v myokardu selhávajících srdcí, které byly explantovány z těla příjemce během transplantace.

V odborné literatuře roste počet preklinických studií zkoumajících apoptózu a možnosti jejího ovlivnění na zvířecích modelech. Zvýšený výskyt apoptózy v myokardu po reperfuzním poškození u králíků pozoroval Gottlieb a spol. (1994). Cheng a spol. (1996) pozoroval sníženou expresi Bcl-2 proteinu (antiapoptotický účinek) a naopak zvýšenou expresi Bax proteinu (proapoptotický účinek) v krysích myocytech bezprostředně přiléhajících k infarktové zóně a předpokládal, že apoptóza může způsobovat následnou remodelaci postiženého myokardu. Condorelli a spol. (2001) ukázali, že pokud podstoupí transgenně modifikované myši, zvýšeně exprimující kaspázu-3 v srdci, ischemicko-reperfuzní poškození myokardu, dojde u nich k nárůstu velikosti infarktu a mají výraznou náchylnost k úmrtí. Příčinnou souvislost apoptózy v myším myokardu s rozvojem dilatace a dysfunkce srdečních oddílů rovněž popisuje Wencker a spol. (2003). Baldi a spol. (2002) zaznamenal

pozitivní korelaci mezi četností apoptózy myocytů u člověka s následnou remodelací myokardu. Xu a spol. (2006) předpokládají, že kardioprotektivní efekt estrogenu je vyvolán inhibicí TNF- α v ischemickém myokardu. Dochází tak k redukcí apoptózy a nekrózy, což může znamenat lepší reparační schopnost kontraktilních funkcí. Wei a spol. (2017) zjišťovali vliv malých interferujících úseků RNA (siRNA), cíleně modulující transkripční i translační mechanismus exprese tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF- α), C3 složky komplementu a FAS genu, na velikost apoptózy a zánětu u prasečích srdcí. Z jejich závěrů vyplývá, že cílená blokáda buněčných drah apoptózy a zánětu pomocí siRNA může prodloužit dobu ischemie transplantovaného štěpu. Podobné výsledky s utlumením apoptózy při uchovávání myších srdečních štěpů v roztoku obsahující siRNA byly pozorovány taky na ledvinných orgánových štěpech (Zheng a spol. 2009, 2016). Taktéž pozitivní ovlivnění exprese antiapoptických genů rodiny Bcl-2 vedlo na myším modelu ke zlepšení funkce i prodloužení životnosti srdečních štěpů (Smyth a spol. 2017).

I když existují ojedinělé studie zabývající se otázkou apoptózy v lidském myokardu u pacientů po transplantaci srdce při akutní rejekci (Koch a spol. 2008), které hodnotí vztah mezi stupněm rejekce a sérovými ukazateli apoptózy (Sánchez a spol. 2012), neexistují zatím studie, které by porovnávaly rozdíly ve výskytu apoptózy v ženských a mužských dárcovských srdcích v souvislosti s perioperační ischemií. Také doposud není nic známo o chování myokardu za nestandardních podmínek, jako je transplantace ženského srdce mužskému příjemci a naopak transplantace mužského srdce ženskému příjemci. Lze předpokládat, že výskyt i průběh apoptózy může být v těchto případech odlišný v porovnání s případy, kdy dárce i příjemce jsou stejného pohlaví.

3.5. Selhání dárcovského štěpu po transplantaci srdce

Primární selhání srdečního štěpu (primary graft dysfunction – PGD) stále zůstává život ohrožující komplikací po transplantaci srdce a hlavní příčinou předčasného úmrtí. Incidence PGD v publikovaných studiích se pohybuje od 2,3% do 28,2% (Russo a spol. 2010, D'Alessandro a spol. 2010). Je definován jako dysfunkce levé a/nebo pravé komory srdeční, která se vyskytne do 24 hodin po transplantaci a není způsobena hyperakutní rejekcí, vysokou plicní rezistencí nebo chirurgickou komplikací (Kobashigawa a spol. 2014). I když patogeneze PGD je stále nejasná, ischemicko-reperfuční poškození je považováno za hlavní

faktor vyvolávající selhání myokardu po transplantaci (Iyer a spol. 2011). Poškození srdečního štěpu při mozkové smrti může sehrát rovněž určitou roli (Ranasinghe a Bonser 2011).

Jak nekróza, tak apoptóza přispívají ke ztrátě kardiomyocytů během ischemicko-reperfuzního poškození a tato ztráta myocytů může nakonec vést k PGD. Predikce primárního selhání štěpu je poměrně složitá. Nicméně existují práce, které dávají do souvislosti primární selhání štěpu a zvýšené plazmatické koncentrace srdečních troponinů u dárce. Potapov a spol. (2001) prokázali, že výrazně zvýšené plazmatické koncentrace troponinů u dárce (troponin I > 1.6 mcg/l a troponin T > 0.1 mcg/l) predikují dysfunkci štěpu po transplantaci a doporučují proto stanovení jejich hladiny za účelem výběru vhodného dárce. Khush a spol. (2007) pozorovali, že středně zvýšená plazmatická koncentrace troponinu I (> 1.0 mcg/l) byla spojena s delší hospitalizací, ale neměla vliv na mortalitu či nutnost užití mechanické podpory oběhu po transplantaci.

Programovaná buněčná smrt se pravděpodobně významnou měrou podílí na rozvoji primárního selhání štěpu. Stoica a spol. (2003) pozorovali zvýšenou expresi genů spojených s apoptózou (Bcl-2, kaspáza-3, FasL) v dárcovských srdcích ve srovnání s kontrolní skupinou. Chalabreysse a spol. (2004) prokázali, že mozková smrt měla za následek indukci apoptózy v pravé komoře, ale vysoký výskyt apoptózy v bioptických vzorcích myokardu nekoreloval s funkcí srdce po transplantaci. Přítomnost apoptózy v dárcovských štěpech je zřejmá, nicméně zatím nebyla nalezena jasná souvislost s dysfunkcí dárcovského srdečního štěpu v potransplantačním období.

4. Hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Chování ženského a mužského srdečního štěpu u pacientů po transplantaci srdce se výrazně liší v krátkodobém i dlouhodobém horizontu.

Cílem práce bylo přispět k objasnění patofyziologických pochodů probíhajících v dárcovském myokardu po transplantaci do těla příjemce opačného pohlaví.

4.1. Dílčí cíle dizertační práce

Na základě studia dostupných literárních údajů a zvážení našich metodických možností jsme si stanovili tyto jednotlivé cíle disertační práce:

- i. Zjistit citlivost k ischemii u dárcovského mužského a ženského myokardu. Do jaké míry ovlivňuje apoptózu v časném pooperačním období ischemie štěpu a zda i za těchto podmínek (ochrana myokardu pomocí kardioplegie) se uplatňují pohlavní rozdíly v odolnosti k ischemii - Studie 1.

Hypotéza: Ženské srdce (srdeční štěp) je odolnější k ischemii než srdce mužské.

- ii. Jak se bude chovat (sledovaným faktorem je apoptóza) mužské srdce v těle ženy a obráceně ženské srdce v těle muže u pacientů po transplantaci srdce - Studie 2.

Hypotéza: Ženský myokard podléhá apoptóze méně než myokard mužský.

- iii. Zjistit, jestli markery buněčné smrti (nekrózy a apoptózy) přítomné v dárcovském myokardu můžou predikovat primární selhání srdečního štěpu po transplantaci - Studie 3.

Hypotéza: Ukazatele buněčné smrti v dárcovském štěpu predikují selhání srdce po transplantaci.

5. Metodika a výsledky

V období od začátku září roku 2010 do konce ledna roku 2015 jsme u pacientů, kteří podstoupili ortotopickou transplantaci srdce v IKEM Praha, prováděli sběr krevních a bioptických vzorků. Podle charakteru studie byli pacienti zařazováni v daných časových obdobích do příslušných studií. Tyto studie spolu navzájem úzce souvisely a aplikované laboratorní a imunohistochemické metody byly pro všechny tři studie společné.

Výběr vhodných dárců se uskutečnil podle standardních doporučených postupů akceptovaných v IKEM Praha. Studie byla schválena etickou komisí, informovaný písemný souhlas byl získán od všech pacientů zařazených do tohoto výzkumu. Všichni pacienti byli léčeni podle současných platných doporučených postupů pro léčbu srdečního selhání a transplantaci srdce. Srdeční zástava a ochrana myokardu byla iniciována studenou krystaloidní kardioplegií St. Thomas (1500 ml, pH 7,4; 4-10 °C). Pro transport byl srdeční štěp rovněž uskladněn v tomto roztoku a vše bylo obklopeno ledem. Během operace byla ochrana srdečního štěpu zajištěna studenou krevní kardioplegií (4°C) opakující se v pravidelných intervalech po 20 minutách.

5.1. Stanovení vysoce citlivého kardiálního troponinu T (hs-cTnT)

Byly analyzovány dva základní typy buněčné smrti buněk myokardu: nekróza a apoptóza. Preferovaným markerem ischemického poškození myokardu v klinické praxi je srdeční troponin, respektive jeho kardiální izoforma (cTnT), která má jedinečné aminokyselinové složení a je proto pro myokard specifická. Molekulární hmotnost cTnT je 39,7 kD. Poměrně nedávný vývoj testu vysoce citlivého kardiálního troponinu T (hs-cTnT) umožňuje detekci velmi nízkých hladin cTnT. Proto jsme jej rovněž zvolili jako marker nekrotického poškození kardiomyocytu. Detekce hs-cTnT byla uskutečněna pomocí elektrochemiluminiscenčního imunostanovení „ECLIA“ na analyzátoru firmy Roche Cobas e411 (T hs STAT, Cobas e411, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) podle doporučení výrobce v akreditované laboratoři. Parametry testu: detekční limit testu byl 5 ng/l, rozsah měření 3 až 10 000 ng/l, vnitřní variační koeficient $\leq 10 \%$ při 13ng/l, horní referenční limit byl stanoven 13ng/l.

5.2. Detekce apoptózy

Apoptóza byla analyzována z bioptických vzorků pravé komory srdeční. Bioptické vzorky byly fixovány v 10% roztoku formalinu a následně zality do parafrinových bločků. Pro potřeby dalších vyšetření byly tyto bločky krájeny mikrotomem na 4 μ m plátky, fixovány na podložní sklíčka a barveny hematoxylin-eosinem (H&E). Z odebraných vzorků byla přítomnost apoptózy hodnocena imunohistochemickou detekcí proapoptotických proteinů kaspázy-3 a antiapoptotických proteinů Bcl-2 a taktéž pomocí metody TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling, TUNEL assay).

Kaspáza-3 byla stanovována na 4 μ m parafrinových řezech pomocí monoklonální protilátky (klon JHM 62, Novocastra, Leica Microsystems, UK) s použitím automatizovaného imunohistochemického barvicího systému VENTANA BenchMark ULTRA (Tucson, AZ, USA) a detekční sady ultraView Universal DAB Detection Kit. Tento kit funguje na principu detekce specifických králičích a myších primárních protilátek, které se váží na antigen tkání parafrinových řezů. Specifická (primární) protilátka je lokalizována směsí sekundárních protilátek označených enzymem. Vzniklý komplex byl vizualizován chromogenním substrátem diaminobenzidinu (DAB) za vzniku hnědé sraženiny. Detekce aktivní kaspázy-3 a prokaspázy-3 ve Studii 3 byla provedena pomocí protilátky (clone 31A1067, Abcam, UK).

Imunohistochemická detekce Bcl-2 (klon 3.1, Novocastra, Leica Microsystems, UK) byla taky provedena na 4 μ m tlustých parafrinových řezech použitím dvoustupňové nepřímé metody. Řezy byly nanášeny na sklíčka, deparafrinovány v xylenu a rehydratovány v postupně se snižujících koncentracích etanolu. K demaskování antigenu (antigen retrieval) byla užitá tepelná indukce v EDTA pufru o pH 8,0. Účinek endogenních peroxidáz byl eliminován promytím v roztoku 0,3% peroxidu vodíku se 70 % metanolem po dobu 30 minut. Primární protilátka byla aplikována 30 minut a detekce protilátky byla prováděna pomocí *N*-Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI) - univerzální imuno-peroxidázový polymer, anti-myší a anti-králičí. V konečné fázi byly vzorky vizualizovány chromogenním substrátem Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako, Glostrup, Denmark) a kontrastně dobarveny Harrisovým hematoxylinem.

Průkaz apoptózy metodou TUNEL, kdy se enzymem terminální deoxynukleotidyl-transferázou (TdT) naváže na 3'OH konce dvouvláknových fragmentů DNA, typických pro apoptózu, označený deoxyuridintrifosfát (dUTP), byl proveden pomocí soupravy TUNEL peroxidase apoptosis detection kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Deparafrinované

řezy o tloušťce 4 um byly předběžně ošetřeny proteinázou K (20 ug / ml) po dobu 10 minut při 37 ° C. Po promytí ve fosfáty pufovaném fyziologickém roztoku (PBS) o pH 7,2 byl účinek endogenních peroxidáz inaktivován 0,3% peroxidem vodíku (30 minut). Po té byly vzorky při teplotě 37 ° C inkubovány jednu hodinu s reakční směsí metody TUNEL (enzym TdT + fluoresceinem označené dUTP). Dále byly vzorky inkubovány 30 min s anti fluoresceinovou protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou při pokojové teplotě a opět vizualizovány chromogenním substrátem DAB. Kontrastní dobarvení bylo provedeno hematoxylinem.

Konečné hodnocení vzorků všech uvedených imunohistochemických metod (kaspáza-3, Bcl-2, TUNEL) bylo provedeno pomocí světelného mikroskopu (Olympus BX41). Počet pozitivních buněk byl počítán v 10 zorných polích vysokého rozlišení (HPF – high power field) a pro statistickou analýzu byl použit průměrný počet pozitivních buněk na 1 HPF.

5.3. Studie 1

5.3.1. Pacienti a sběr dat

První studie zahrnovala 81 po sobě jdoucích pacientů, kteří podstoupili od září 2010 do ledna 2013 ortotopickou transplantaci srdce na našem pracovišti. Pacienti byli podle pohlaví dárce rozděleni do dvou skupin: mužský štěp (n = 49) a ženský štěp (n = 32). Vzorky krve pro stanovení hs-cTnT byly odebrány v předem určených intervalech: před otevřením perikardu u dárce a před provedením sternotomie u příjemce, 2h po transplantaci (2h po uvolnění příčné aortální svorky), 1. pooperační den (1. POD, 24h po uvolnění příčné aortální svorky), 3. POD a 7. POD. Každý vzorek byl centrifugován a uskladněn při teplotě -70°C.

V běžné praxi se pro výběr vhodného dárce používá poměr hmotnostní mezi příjemcem a dárce (rozdíl by neměl přesáhnout 20%). Je známo, že hmotnost jedince s velikostí srdce nemusí souviset, navíc se velikost a hmotnost srdce u mužů a žen liší (Ošťádal a spol. 2009). Abychom co nejvíce eliminovali zmíněné skutečnosti, přepočítali jsme naměřené hodnoty hs-cTnT na jednotku hmotnosti srdeční tkáně. Vážení dárcovských srdcí během transplantace nebylo prakticky proveditelné, proto byla hmotnost obou srdečních komor vypočtena pomocí vzorců uvedených v literatuře. Pro levou komoru jsme použili následující rovnici: $Masa\ myokardu\ levé\ komory\ (g) = a \cdot výška^{0,54}\ (m) \cdot Hmotnost^{0,61}\ (kg)$.

Při výpočtu hmotnosti LK u žen byla hodnota $a = 6.82$, u mužů $a = 8.25$. Pro výpočet hmotnosti pravé komory byl použit jiný vzorec: $\text{Masa myokardu pravé komory (g)} = a \cdot \text{věk}^{0,32} \text{ (roky)} \cdot \text{výška}^{1,135} \text{ (m)} \cdot \text{Hmotnost}^{0,315} \text{ (kg)}$, kde $a = 10,59$ pro ženy a $11,25$ pro muže (Reed a spol. 2014).

Apoptóza byla v této části studie, zkoumající pohlavní rozdíly v odolnosti k ischemii, hodnocena z bioptických vzorků odebraných přímou biopsií z pravé komory srdeční: před samotným odběrem dárcovského štěpu, dvacet minut po uvolnění příčné aortální svorky a jeden týden po transplantaci endomyokardiální biopsií (EMB).

5.3.2 Statistické zpracování

Statistická analýza byla provedena za použití SAS softwaru JMP verze 11.0.0. Naměřené údaje jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty \pm střední chyby průměru (SE). Data s negaussovským rozložením byla vyjádřena jako medián [interkvartilové rozpětí]. Diskrétní veličiny byly porovnávány pomocí kontingenčních tabulek Pearsonovým chí-kvadrát testem, spojitě veličiny metodou analýzy rozptylu – ANOVA. Rozdíly v expresi Bcl-2, kaspázy 3 a TUNEL mezi skupinami byly hodnoceny pomocí neparametrického Kruskal-Wallisova testu; pro časové porovnání rozdílů mezi skupinami byl použit Wilcoxon signed rank test s Bonferroniho korekcí jednotlivých hladin významnosti. Rozdíly v hladinách hs-cTnT (přepočteny na jednotku hmotnosti srdeční tkáně) mezi skupinami byly po logaritmické korekci porovnávány pomocí analýzy rozptylu ANOVA s opakovanými měřeními. Statistické rozdíly byly považovány za významné při $P < 0,05$.

5.3.3. Výsledky Studie 1

V základních demografických datech sledovaného souboru nebyly významné rozdíly mezi skupinou mužských a ženských dárců s výjimkou příčiny úmrtí; u ženských dárců byl vyšší výskyt intracerebrálních hemoragií. Průměrná doba studené ischemie dárcovského srdce se u obou skupin významně nelišila: $146 \pm 7,8$ minut u skupiny s mužským štěpem a $141 \pm 9,0$ minut u skupiny se ženským allograftem. Základní údaje o dárcích před odběrem a dobu ischemie srdečního štěpu uvádí tabulka č. 2. Jediným rozdílem mezi skupinami příjemců byl větší počet pacientů v terminálním stádiu onemocnění některé ze srdečních chlopní ve skupině příjemců ženského allograftu. Předoperační údaje příjemců srdce uvádí tabulka č. 3.

Tabulka č. 2. Základní údaje o dárcích před odběrem a doba ischemie srdečního štěpu.

CMP – cévní mozková příhoda.

	Dárce - muž	Dárce - žena	Hodnota p
Počet pacientů	49	32	
Věk (průměr ± SD)	39,6 ± 1,7	42,3 ± 2,7	0,38
BMI (průměr ± SD)	26,5 ± 0,6	25,0 ± 0,7	0,11
Diabetes mellitus	0	0	0,21
Hypertenze	7	6	0.59
EF LK (%)	63,4 ± 0,7	64,5 ± 1,3	0,45
Kouření v anamnéze	4	2	0,71
Příčina úmrtí:			
CMP (krvácivá)	14	22	0,0004
Trauma	25	8	0,02
Jiné	10	2	0,08
Inotropika	42	25	0,29
Doba ischemie (min.)	146,0 ± 7,8	141,1 ± 9,0	0,70

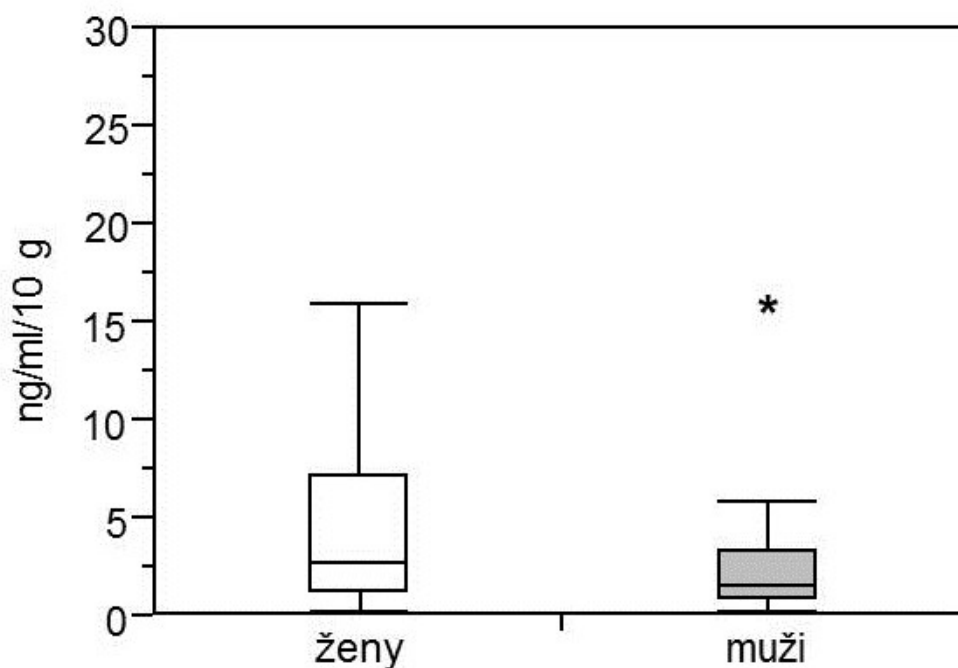
Tabulka č. 3. Předoperační údaje příjemců srdce, rozděleno do skupin dle pohlaví dárce.

KMP - kardiomyopatie, OTS - ortotopická transplantace srdce, MSP - mechanická srdeční podpora.

	Dárce - muž	Dárce - žena	Hodnota p
Počet pacientů	49	32	
Věk (průměr ± SD)	51,8 ± 1,8	49,8 ± 2,7	0,50
BMI (průměr ± SD)	25,1 ± 0,5	24,5 ± 0,7	0,44
Diabetes mellitus	5	7	0,15
Hypertenze	7	4	0,45
Kreatinin (μmol/l)	103,1 ± 3,7	95,65 ± 6,0	0,27
Ischemická KMP	18	9	0,42
Dilatační KMP	29	15	0,28
Jiné diagnózy	2	8	0,005
Kouření v anamnéze	4	3	0,59
Inotropika před OTS	11	7	0,97
MSP před OTS	19	11	0,69

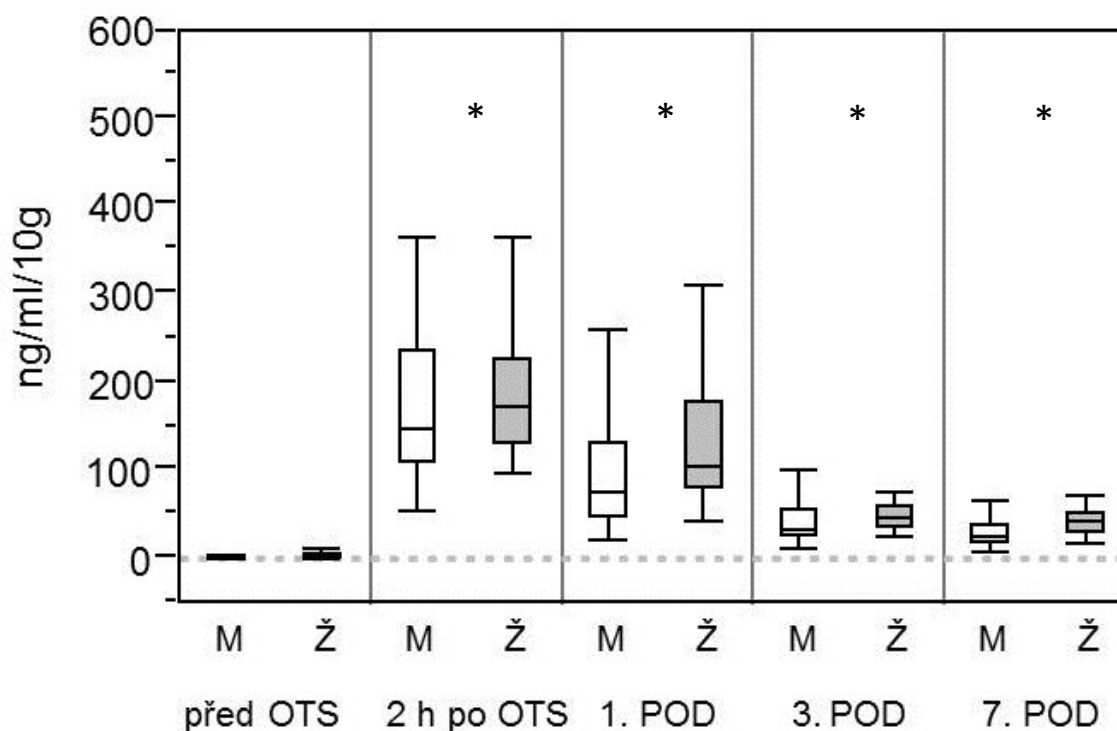
Před transplantací byla plazmatická koncentrace hs-cTnT přepočtená na jednotku hmotnosti srdeční tkáně signifikantně vyšší u dárců ženského pohlaví: 2,6 [0,2 - 7,2] vs. 1,4 [0,8 - 3,3], $P=0,025$ (graf č. 1). V markerech apoptózy (Bcl-2, kaspáza-3, TUNEL) v dárcovském srdci před transplantací nebyly rozdíly mezi oběma skupinami.

Graf č. 1. Plazmatická koncentrace high-sensitive troponinu T (hs-TnT) přepočtená na jednotku hmotnosti srdeční tkáně u dárce srdce před transplantací. * $P=0,025$ ženy vs. muži.



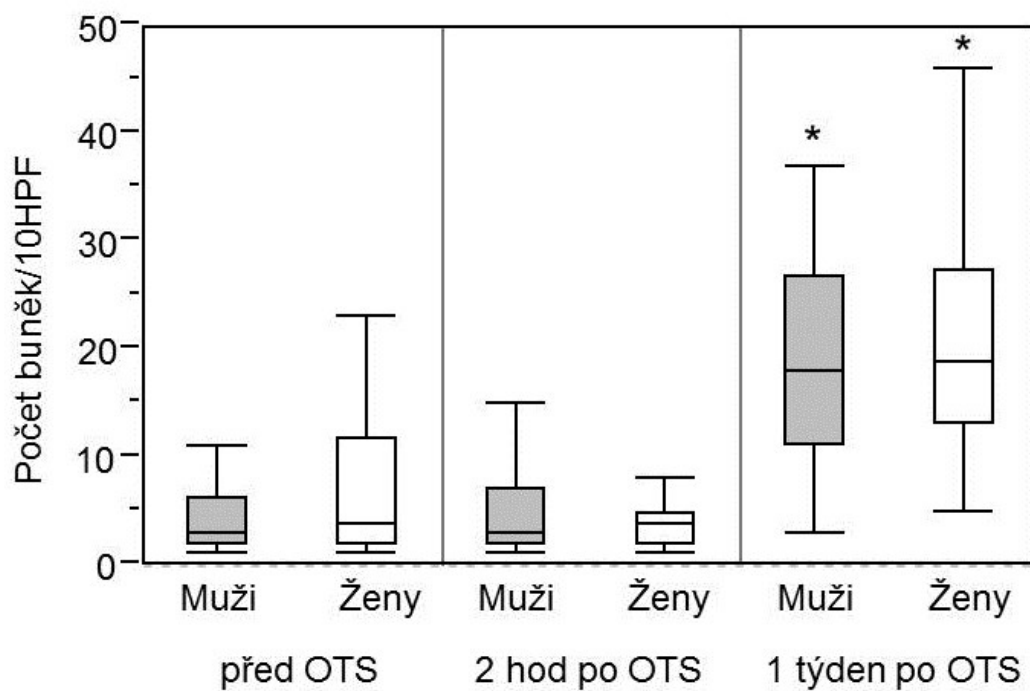
V celém sledovaném období po transplantaci jsme pozorovali významně vyšší plazmatické koncentrace troponinu T přepočtené na jednotku hmotnosti srdeční tkáně u srdcí od ženských dárců: dvě hodiny po OTS 172,4 [130,4 - 228,6] vs. 148,2 [109,3 - 237,6], $P=0,039$; 24 hodin po OTS 106,9 [79,7 - 181,9] vs. 76,7 [47,2 - 135,0], $P=0,007$; třetí den po OTS 47,9 [36,4 - 61,9] vs. 34,6 [25,0 - 57,2], $P=0,019$; týden po OTS 43,6 [29,8 - 56,4] vs. 26,6 [20,1 - 39,6], $P<0,001$. Největšího rozdílu mezi skupinami bylo dosaženo 24 hodin po ukončení studené ischémie srdečního štěpu a týden po transplantaci (graf č. 2).

Graf č. 2. Plazmatická koncentrace high-sensitive troponinu T (hs-cTnT) přepočtená na jednotku hmotnosti srdeční tkáně u pacientů po transplantaci srdce (OTS) s mužským štěpem (M) a ženským štěpem (Ž). V celém sledovaném období byla signifikantně vyšší hladina u pacientů s ženským štěpem (* $P < 0,05$) s největšími rozdíly 24 hodin (1. pooperační den – POD) a týden po transplantaci.

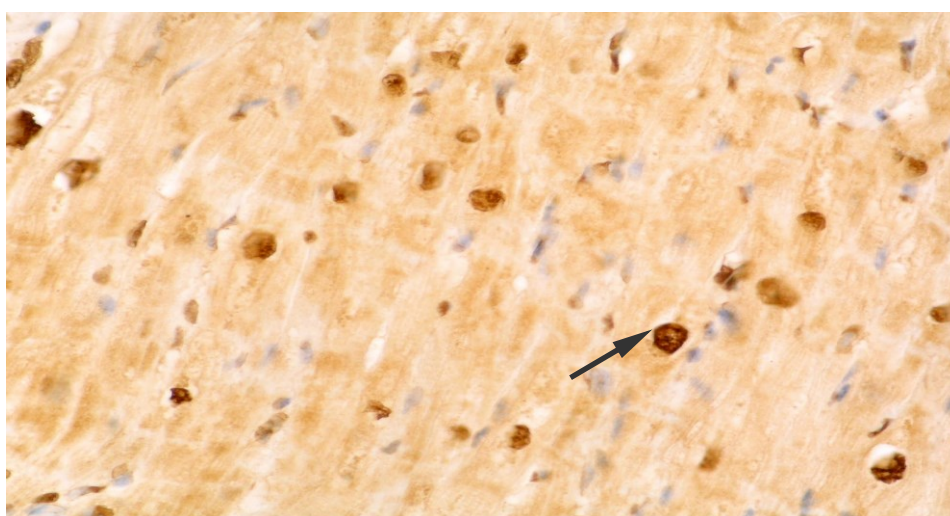


Při detekci apoptózy metodou TUNEL jsme pozorovali významně vyšší počet TUNEL pozitivních myocytů v dárcovských srdcích obou pohlaví 7 dní po transplantaci ve srovnání s počtem před transplantací: mužské allografty 18,0 [11,0 – 27,0] vs 3,0 [2,0 – 6,3], $P < 0,001$; ženské allografty 19,0 [13,0 – 27,5] vs. 4,0 [2,0 – 12,0], $P < 0,001$; rozdíl v počtu TUNEL pozitivních myocytů (obrázek č. 11) mezi mužskými a ženskými allografty 7 dní po transplantaci nebyl pozorován (graf č. 3).

Graf č. 3. Počet TUNEL pozitivních buněk na 10 HPF (high-power field) před a po OTS v mužských a ženských allografech. * $P < 0,001$, počet TUNEL pozitivních buněk u allograftů obou pohlaví 7 dní po OTS vs. před OTS.

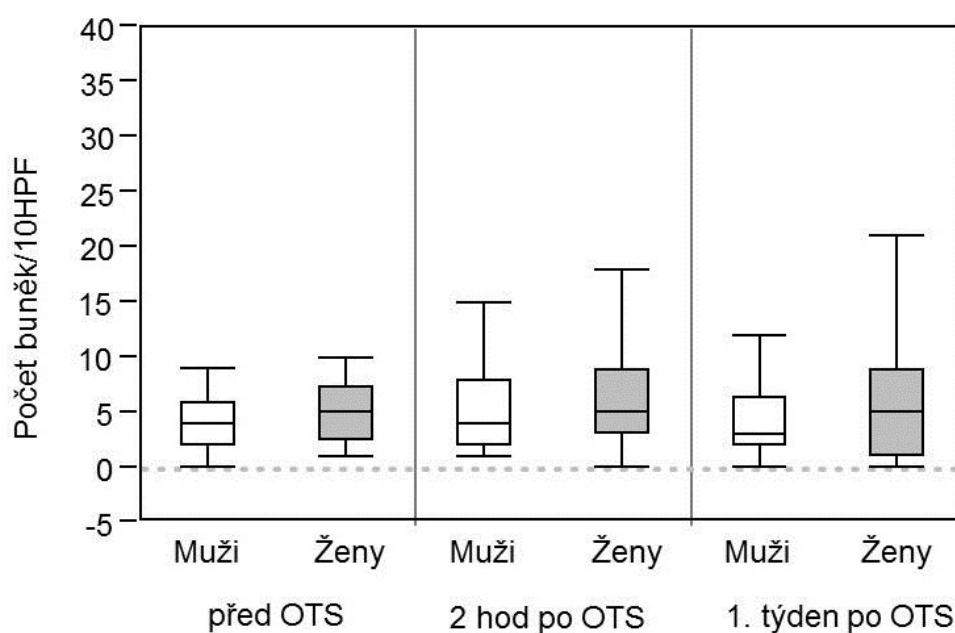


Obrázek č. 11. Imunohistochemické vyšetření myokardu – šipka označuje TUNEL pozitivní jádro.

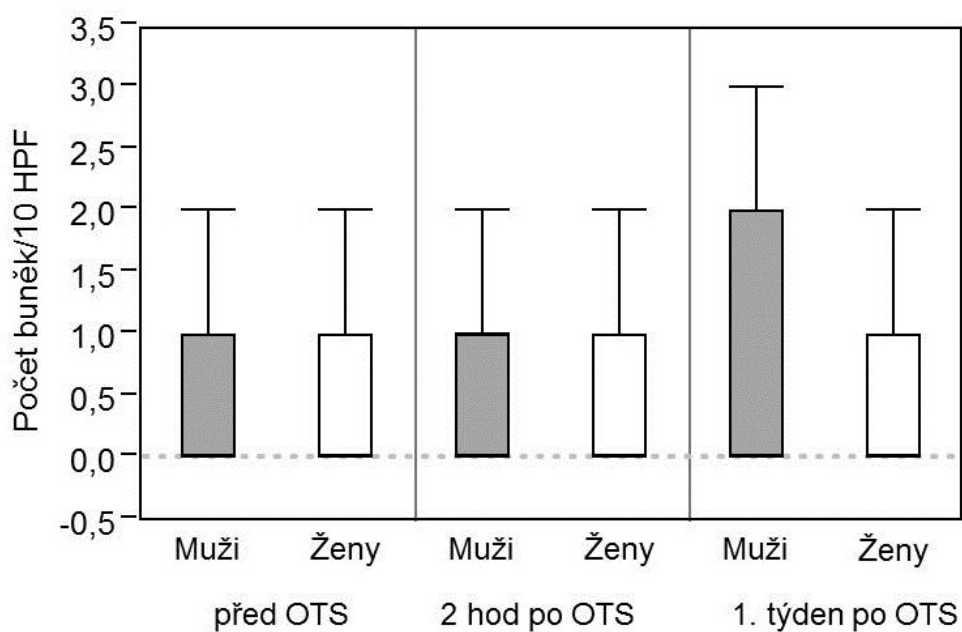


Ve sledovaném období jsme nenalezli rozdíly v expresi kaspázy-3 (graf č. 4) a Bcl-2 (graf č. 5) v srdcích od ženských a mužských dárců před a po transplantaci. Na obrázcích č. 12 a 13 je zobrazena imunohistochemická detekce těchto proteinů.

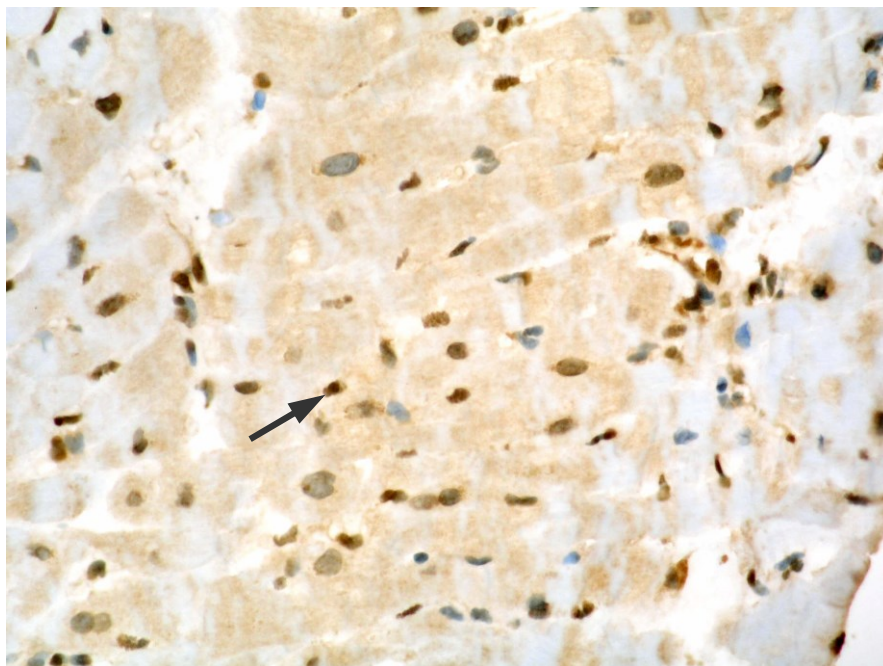
Graf č. 4. Počet kaspáza-3 pozitivních buněk na 10 HPF (high-power field) před a po OTS v mužských a ženských allograftech.



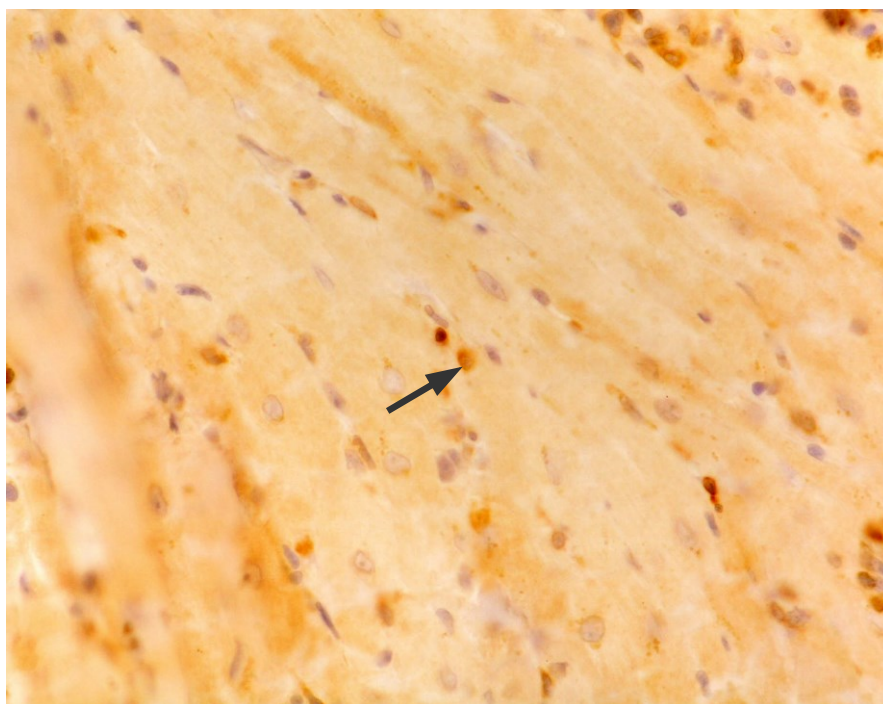
Graf č. 5. Počet Bcl-2 pozitivních buněk na 10 HPF (high-power field) před a po OTS v mužských a ženských allograftech.



Obrázek č. 12. Imunohistochemické vyšetření vzorku tkáně – šipka označuje kaspása-3 pozitivní jádro.



Obrázek č. 13. Imunohistochemické vyšetření myokardu – šipka označuje Bcl-2 pozitivní jádro.



5.4. Studie 2

5.4.1. Pacienti a sběr dat

Studie zahrnovala celkem 58 pacientů. Vytvořili jsme čtyři pracovní skupiny podle pohlaví příjemce a dárce: *skupina 1* (příjemce muž – dárce muž), *skupina 2* (příjemce žena – dárce žena), *skupina 3* (příjemce muž – dárce žena), *skupina 4* (příjemce žena – dárce muž). S ohledem na počty prováděných transplantací srdce na našem pracovišti, po předchozím prostudování transplantačních registrů IKEM Praha a časové možnosti výzkumu, jsme za ideální počet pacientů v každé skupině stanovili 15 pacientů. Abychom i do čtvrté skupiny mohli zařadit srovnatelný počet pacientů, neboť najít vhodného mužského dárce pro ženského příjemce je časově náročnější než pro ostatní skupiny, probíhal sběr dat déle než ve Studii 1 a to od září 2010 do ledna 2015. Za uvedené časové období bylo v možnostech našeho pracoviště zařadit 15 pacientů do *skupiny 1*, 15 pacientů do *skupiny 2*, 16 pacientů do *skupiny 3* a 12 pacientů do *skupiny 4*. Nicméně z poslední uvedené skupiny 2 pacienti nedokončili kompletní dvouleté sledování. Jeden pacient zemřel a druhý odmítl poslední EMB ze zdravotních a sociálních důvodů. Kromě pěti pacientů *skupiny 4*, kteří byli zařazeni mezi lednem 2013 a lednem 2015, byly všechny skupiny tvořeny pacienty účastníky se i předchozí studie.

Bioptické vzorky byly odebírány jak přímou biopsií z pravé komory srdeční během odběru srdce a samotné transplantace, tak pomocí EMB z pravé komory srdeční v časových intervalech shodujících se s pravidelnými kardiologickými kontrolami (tabulka č. 4).

5.4.2. Statistické zpracování

Statistická analýza byla provedena za použití SAS softwaru JMP verze 11.0.0. Naměřené výsledky jsou uváděny jako průměrné hodnoty \pm střední chyby průměru (SE). Data s negaussovským rozložením byla vyjádřena jako medián [interkvartilové rozpětí]. Diskrétní veličiny byly porovnávány pomocí kontingenčních tabulek Pearsonovým chí-kvadrát testem, spojitě veličiny metodou analýzy rozptylu – ANOVA. Skupiny mezi sebou (rozdíly v apoptóze) byly porovnávány pomocí neparametrického Kruskal-Wallisova testu, v případě nalezení významných rozdílů byla k dourčení rozdílu mezi dvojicemi skupin (post-hoc test) použita metoda mnohonásobného srovnávání (Steel-Dwass test). K párovému srovnání (před svorkou a jiný čas) byl použit párový t-test. Statistické rozdíly byly považovány za významné při $P < 0,05$.

Tabulka č. 4. Časové rozložení odběru bioptických vzorků.

Číslo vyšetření (biopsie)	Doba odběru vzorku	Vyšetření
1.	Biopsie před podáním kardioplegie při odběru štěpu	kaspáza-3, Bcl-2, TUNEL
2.	Biopsie 20 min po uvolnění svorky	kaspáza-3, Bcl-2, TUNEL
3.	EMB v 1. týdnu po transplantaci	kaspáza-3, Bcl-2, TUNEL
4.	EMB v 1. měsíci po transplantaci	kaspáza-3, Bcl-2
5	EMB v 6. měsíci po transplantaci	kaspáza-3, Bcl-2
6.	EMB v 12. měsíci po transplantaci	kaspáza-3, Bcl-2, TUNEL
7.	EMB ve 24. měsíci po transplantaci	kaspáza-3, Bcl-2, TUNEL

5.4.3. Výsledky Studie 2

V základních demografických a preoperačních datech nebyl významný rozdíl mezi skupinami zkoumaného souboru; a to jak pro charakteristiku příjemců (tabulka č. 5), tak i dárců (tabulka č. 6).

Tabulka č. 5. Předoperační údaje příjemců srdce, rozděleno do skupin dle pohlaví příjemce a dárce.
KMP - kardiomyopatie, OTS - ortotopická transplantace srdce, MSP - mechanická srdeční podpora.

	Skupina 1 Muž - Muž	Skupina 2 Žena – Žena	Skupina 3 Muž - Žena	Skupina 4 Žena - Muž	P
Počet pacientů	15	15	16	10	
Věk (průměr ± SD)	52,1 ± 2,2	46,5 ± 3,7	53,9 ± 2,9	48,3 ± 4,2	0,41
BMI (průměr ± SD)	23,8 ± 0,9	24,3 ± 1,2	24,6 ± 0,9	24,5 ± 0,8	0,93
Diabetes mellitus	2	2	3	1	0,93
Hypertenze	1	3	4	2	0,59
Kreatinin (μmol/L)	113,2 ± 8,7	95,8 ± 10,4	92,5 ± 6,7	115,6 ± 21,3	0,30
Ischemická KMP	4	4	5	3	0,99
Dilatační KMP	10	7	8	6	0,68
Jiné diagnózy	1	5	3	1	0,25
Kouření v anamnéze	2	1	2	1	0,65
Hs-cTnT (ng/l)	397,6 ± 219,6	115,9 ± 69,4	325,8 ± 264,1	145,9 ± 83,5	0,50
Inotropika před OTS	4	4	3	2	0,95
MSP před OTS	2	5	6	2	0,41

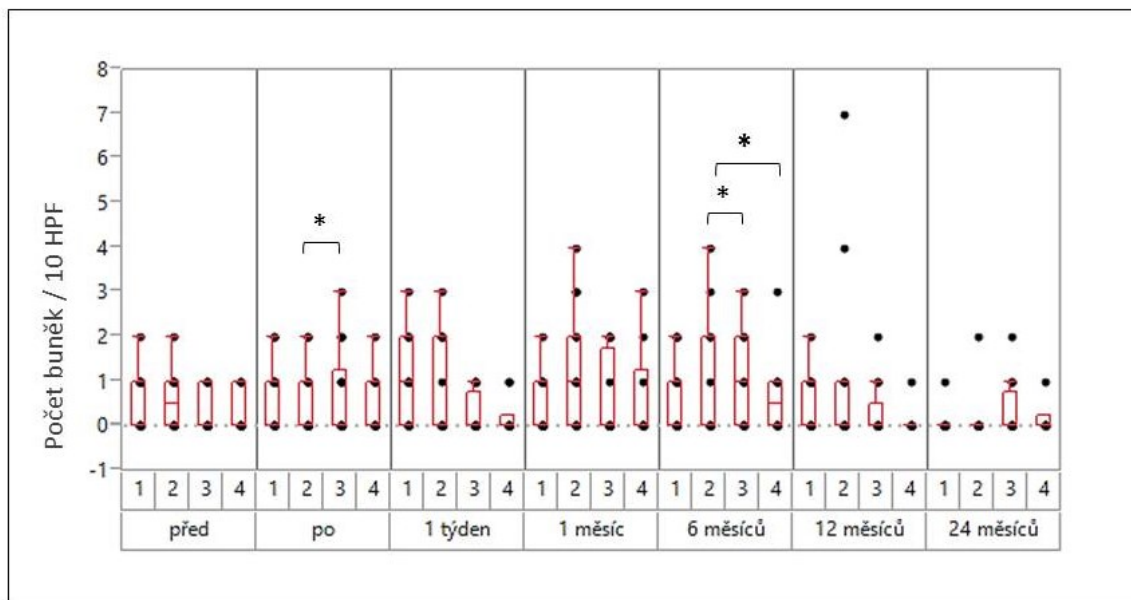
Tabulka č 6. Předoperační údaje dárců srdce, rozděleno do skupin dle pohlaví příjemce a dárce.

	<i>Skupina 1</i> Muž - Muž	<i>Skupina 2</i> Žena – Žena	<i>Skupina 3</i> Muž - Žena	<i>Skupina 4</i> Žena - Muž	<i>P</i>
Počet pacientů	15	15	16	10	
Věk (průměr ± SD)	37,9 ± 2,3	39,7 ± 3,8	45,2 ± 2,7	38,9 ± 3,6	0,32
BMI (průměr ± SD)	25,8 ± 0,9	23,2 ± 0,7	25,8 ± 0,9	24,9 ± 0,4	0,13
Diabetes mellitus	0	0	1	1	0,47
Hypertenze	1	2	4	2	0,55
EF LK (%)	63,5 ± 1,3	61,6 ± 2,1	67,1 ± 1,4	64,5 ± 1,9	0,11
Příčina úmrtí:					
CMP (krvácivá)	5	10	12	6	0,10
Trauma	5	4	3	3	0,82
Jiné	5	1	1	1	0,11
Kouření v anamnéze	3	1	1	1	0,47
Hs-cTnT (ng/l)	81,2 ± 23,3	94,3 ± 30,4	69,7 ± 16,2	73,1 ± 19,5	0,98
Inotropika před OTS	12	10	14	8	0,56
Doba ischémie (min.)	144,3 ± 14,3	143,5 ± 12,0	135,8 ± 16,0	141,2 ± 9,7	0,97

Předoperačně nebyl rozdíl mezi skupinami v expresi kaspázy-3. Nicméně pooperačně jsme pozorovali významný rozdíl mezi *skupinou 2* (příjemce žena – dárce žena) a *skupinou 3* (příjemce muž – dárce žena) 20 minut po transplantaci, ve *skupině 3* byla exprese kaspázy-3 významně vyšší než ve *skupině 2*: 9,0 [5,0 – 17,3] vs. 3,0 [2,5 – 4,5]; $P=0,017$. Měsíc po operaci tento rozdíl dosahoval hranice významnosti ($P=0,056$) a šest měsíců po operaci byla naopak exprese kaspázy-3 významně vyšší ve *skupině 2* než ve *skupině 3*: 14,0 [7,00– 21,0] vs. 3,0 [2,0 – 7,0]; $P=0,024$. Dále jsme detekovali v šestém měsíci po transplantaci významně vyšší expresi kaspázy-3 ve *skupině 2* (příjemce žena – dárce žena) v porovnání se *skupinou 4* (příjemce žena – dárce muž): 14,0 [7,0 – 21,0] vs. 5 [2,8 – 7,0]; $P=0,029$. V ostatních časových obdobích jsme nepozorovali statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami (graf č. 6).

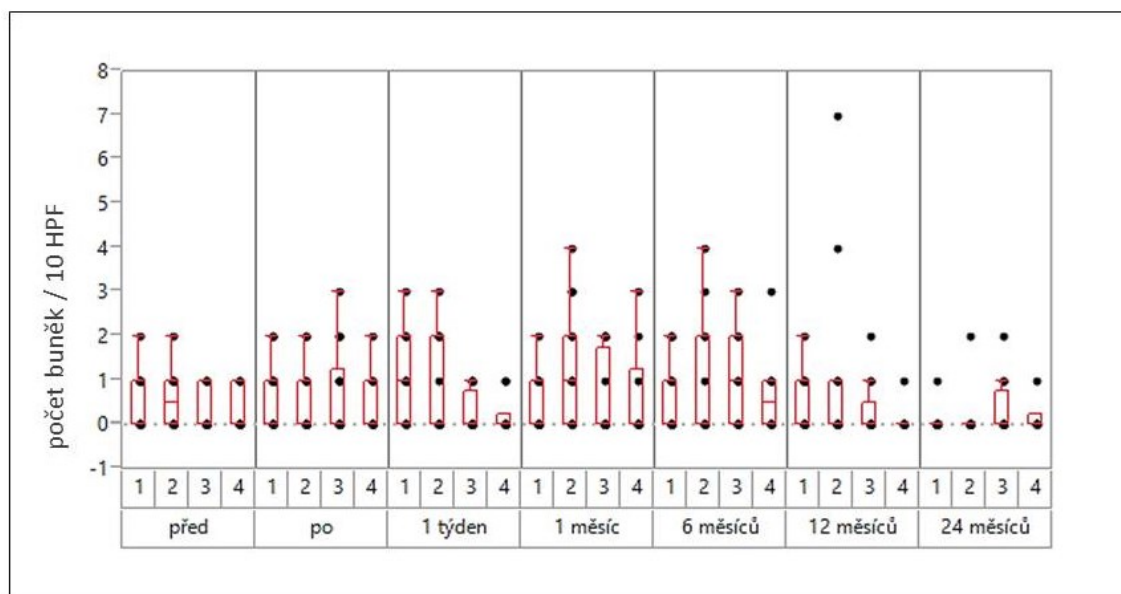
Graf č. 6. Počet kaspáza-3 pozitivních buněk na 10 HPF (high-power field) před a po OTS v myokardu pacientů rozdělených do čtyř skupin dle pohlaví příjemce a dárce.

* $P < 0,05$, počet kaspáza-3 pozitivních buněk: skupina 2 vs. skupina 3 20 min a šest měsíců po OTS; skupina 2 vs. skupina 4 šest měsíců po OTS.



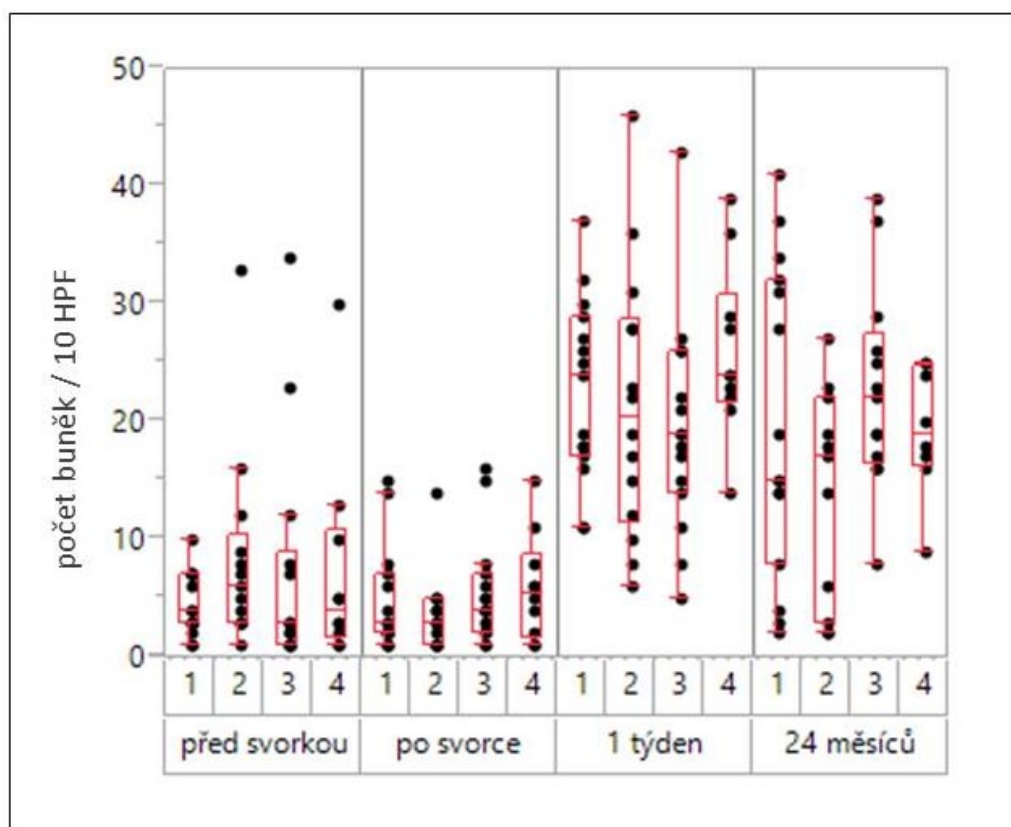
Během sledovaného období jsme nezjistili významný rozdíl v expresi Bcl-2. Pouze jeden týden po transplantaci dosahovala exprese Bcl-2 hranice významnosti mezi skupinami 1 a 3 ($P=0,054$, graf č. 7).

Graf č. 7. Počet Bcl-2 pozitivních buněk na 10 HPF (high-power field) před a po OTS v myokardu pacientů rozdělených do čtyř skupin dle pohlaví příjemce a dárce.



Metodou TUNEL jsme nedetkovali ve sledovaných obdobích statisticky významný rozdíl v apoptóze mezi skupinami, nicméně jsme zjistili významný nárůst TUNEL pozitivních buněk ve všech skupinách oproti předoperačním hodnotám jak týden, tak i 12 a 24 měsíců po transplantaci ($P < 0,001$, graf č. 8).

Graf č. 8. Počet TUNEL pozitivních buněk na 10 HPF (high-power field) před a po OTS v myokardu pacientů rozdělených do čtyř skupin dle pohlaví příjemce a dárce.



5.5. Studie 3

5.5.1. Pacienti a sběr dat

V průběhu získávání vzorků, analýzy dat a monitoringu pacientů pro předchozí studie jsme shromáždili soubor 64 po sobě jdoucích pacientů, kteří podstoupili ortotopickou transplantaci srdce v období od září 2010 do ledna 2013. Podrobná znalost všech klinických dat pacientů ze souboru nás vedla k vytvoření studie, ve které jsme zkoumali, zda vybrané

ukazatele buněčné smrti mají případnou souvislost s primárním selhání srdečního štěpu (PGD) po transplantaci. K průkazu myokardiální nekrózy jsme použili metodu „high sensitive cardiac TnT“ (hs-cTnT). Vzorek krve dárce byl odebrán těsně před otevřením perikardu. Následně byl, ještě před naložením příčné svorky na vzestupnou aortu a podáním kardioplegického roztoku, proveden bioptický odběr vzorku myokardu z pravé komory za účelem průkazu apoptózy (imunohistochemická detekce kaspázy-3, aktivní + prokaspázy-3, Bcl-2 a detekce metodou TUNEL).

5.5.2. Statistické zpracování

Statistická analýza byla provedena za použití Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Prism verze 5.00 pro Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Naměřené údaje jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota \pm střední chyba průměru (SE). Diskrétní veličiny byly porovnávány pomocí kontingenčních tabulek Fisher exact testem, spojitě veličiny metodou analýzy rozptylu – ANOVA. Rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny pomocí Mann-Whitneyova U testu. Statistické rozdíly byly považovány za významné při $P < 0,05$

5.5.3. Výsledky Studie 3

Po transplantaci došlo k rozvoji primárního selhání srdečního štěpu dle nové definice u osmi (14%) pacientů sledovaného souboru. Mezi skupinou pacientů, u nichž došlo k rozvoji primárního selhání štěpu a skupinou bez této komplikace, nebyly rozdíly z hlediska věku dárce ($40,4 \pm 1,8$ vs. $39,8 \pm 5,8$ let), věku příjemce ($52,2 \pm 1,8$ vs. $47,5 \pm 3,4$ let) ani v dalších parametrech, které zahrnovaly příčinu srdečního selhání příjemce, pohlaví dárce a příjemce (tabulka č. 7). Rozdíl mezi skupinami nebyl ani v četnosti pacientů s mechanickou podporou oběhu a významně se nelišila ani doba studené ischémie ($141 \pm 7,3$ vs. $157 \pm 16,7$ min.).

Tabulka č. 7. Základní údaje o dárcích a příjemcích, rozděleno do skupin podle výskytu primárního selhání štěpu (PGD). KMP - kardiomyopatie, OTS - ortotopická transplantace srdce, MSP - mechanická srdeční podpora.

	bez PGD (n = 56)	PGD (n = 8)	
Věk dárce (průměr ± SD)	40,4 ± 1,8	39, 8 ± 5,8	n.s.
Věk příjemce (průměr ± SD)	52,2 ± 1,8	47,5 ± 3,4	n.s.
Pohlaví dárce (muži/ženy)	36/20	3/5	n.s.
Pohlavní příjemce (M/Ž)	44/12	6/2	n.s.
Ischemická KMP	21	1	n.s.
Dilatační KMP	31	5	n.s.
Jiné diagnózy	4	2	n.s.
MSP před OTS	15	4	n.s.
Doba ischemie (min.)	141 ± 7,3	157 ± 16,7	n.s.

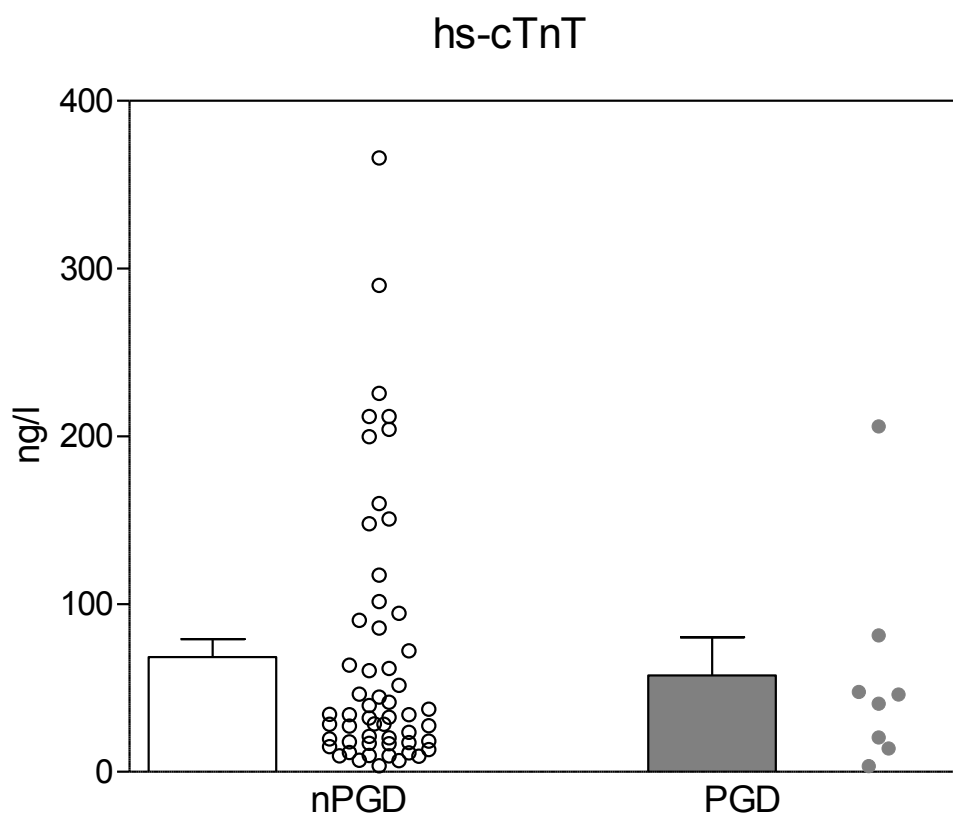
U pacientů s výskytem primárního selhání štěpu po transplantaci srdce byla převaha mužských příjemců (6/8), zatímco mezi dárci převažovaly ženy (5/8). Za povšimnutí stojí, že u tří pacientů z této skupiny došlo k transplantaci ženského allograftu mužskému příjemci (3/8). Selhání levé komory bylo pozorováno u 4 pacientů, selhání pravé komory u 6 pacientů; ve dvou případech se tedy jednalo o oboustranné srdeční selhání. Navzdory výskytu této obávané komplikace bylo 30-denní přežití pacientů 100%. Podrobnější údaje o pacientech s výskytem primárního selhání štěpu uvádí tabulka č. 8.

Tabulka č. 8. Údaje o pacientech s výskytem primárního selhání štěpu (plicní arteriální resistance - PAR uvedena ve Woodových jednotkách, přítomnost selhání levé/pravé komory označena +, nepřítomnost označena -), doba studené ischemie uvedena v minutách.

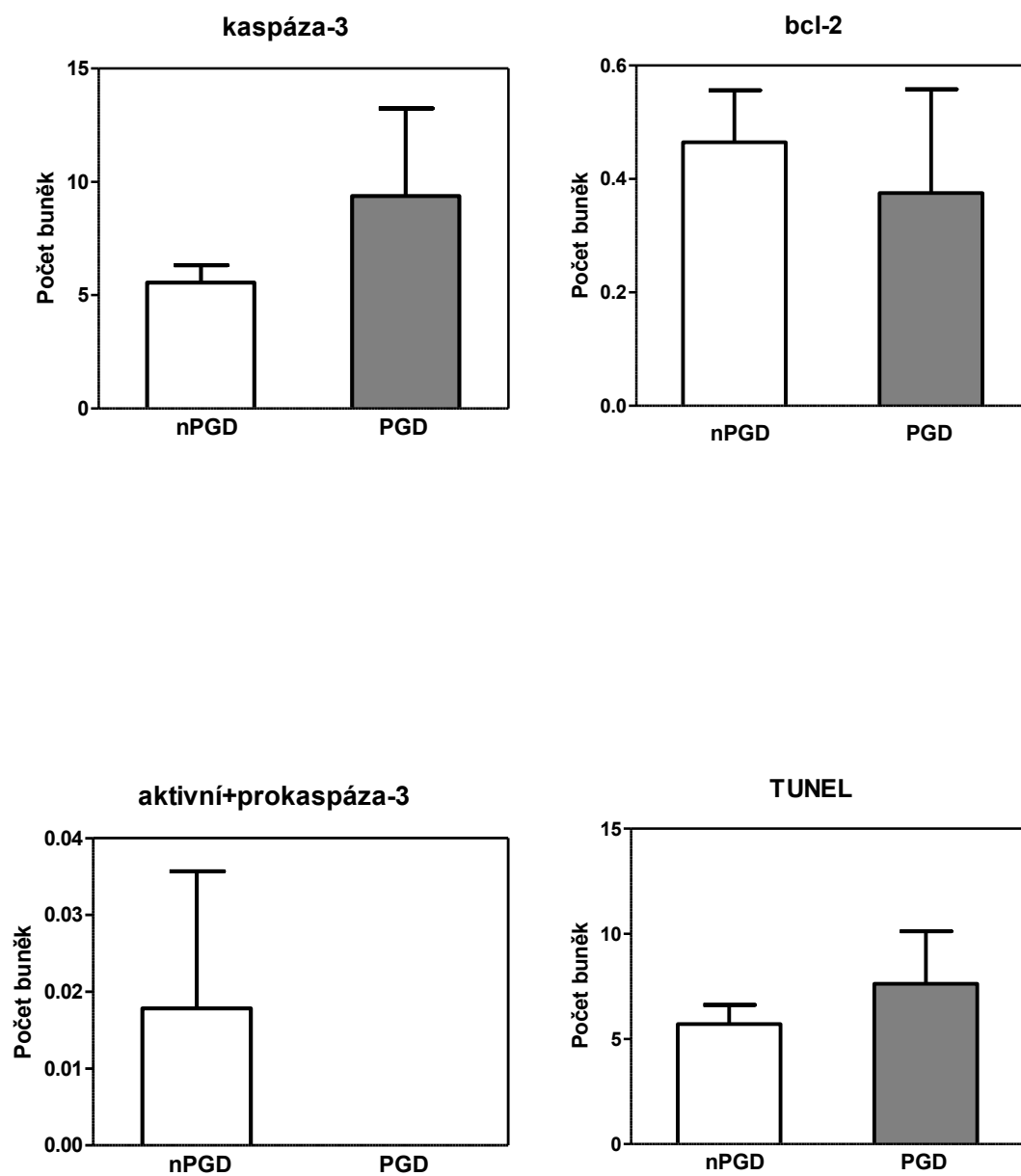
Pacient	Pohlaví dárce	Pohlaví příjemce	Doba ischemie	PAR (WU)	Selhání LK	Selhání PK
1	M	M	83	1,3	+	+
2	M	M	168	1,8	-	+
3	M	M	178	1,9	-	+
4	Ž	Ž	179	1,2	-	+
5	Ž	Ž	140	1,2	-	+
6	Ž	M	225	3,3	+	+
7	Ž	M	188	1,8	+	-
8	Ž	M	100	2,9	+	-

Nezjistili jsme významný rozdíl plazmatické hladiny hs-cTnT u skupiny s rozvojem primárního selhání štěpu (57.4 ± 22.9 ng/L) a hladiny hs-cTnT u skupiny pacientů bez dysfunkce štěpu (68.4 ± 10.8 ng/L), viz graf č. 9. Nelišil se ani výskyt a stupeň apoptózy mezi skupinou s primárním selháním štěpu a skupinou, u které k primárnímu selhání štěpu po transplantaci nedošlo (graf č. 10). Ve studovaném souboru nebyly markery buněčné smrti (nekrózy a apoptózy) prediktorem rozvoje primárního selhání štěpu po transplantaci srdce.

Graf č. 9. Plazmatická koncentrace high-sensitive troponinu T (hs-cTnT) u dárců srdce. Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi hladinou hs-cTnT u skupiny pacientů s primárním selháním štěpu (PGD) a skupinou bez selhání štěpu (nPGD).



Graf č. 10. Markery apoptózy u skupiny pacientů s primárním selháním štěpu (PGD) a skupinou bez selhání štěpu (nPGD) po transplantaci srdce.



6. Diskuze

Vzhledem k faktu, že transplantace srdce patří v kardiochirurgii k výkonům s nejdelší dobou ischemie myokardu, je snaha o minimalizaci délky ischemie základním předpokladem úspěchu srdeční transplantace. Kilic a spol. (2012) ve své práci uvádí, že čím kratší je doba studené ischemie, tím lepší je dlouhodobé přežívání po transplantaci srdce. Již dlouho se ví, že ischemie delší než 4 hodiny je spojena s výrazně horšími výsledky po transplantaci (Del Rizzo a spol. 1999). Z největšího mezinárodního transplantačního registru ISHLT (International Society for Heart and Lung Transplantation) vyplývá, že ischemie štěpu delší než 200 minut představuje nezávislý rizikový faktor pro jednorocní mortalitu a má významný negativní vliv na 5-leté a dokonce i na 15-leté přežití po transplantaci srdce (Stehlik 2012). Ve studii, která vznikla na našem pracovišti a analyzovala výsledky pacientů transplantovaných pro vrozenou srdeční vadu v IKEM, byla identifikována doba studené ischemie delší než 4 hodiny jako silný prediktor perioperační i jednorocní mortality (Bešík a spol. 2016). Protože do celkové doby ischemie je třeba zahrnout i dobu transportu, snažíme se na našem pracovišti pro očekávaně komplikované výkony např. transplantace po korigovaných srdečních vadách, reoperace či transplantace po předchozí implantaci mechanické srdeční podpory, dobu transportu zkrátit na maximum a pro takové výkony se pacienti transportují do IKEM.

Dalšími faktory, které mají významný negativní vliv na jednorocní mortalitu po transplantaci srdce, jsou vyšší věk dárce a výrazný nepoměr hmotnosti dárce a příjemce. Z faktorů, týkajících se pouze příjemce, pak porucha funkce ledvin s elevací hodnot sérového kreatininu u příjemce (zvláště pokud je nutná dialyzační léčba), vysoká plicní rezistence, diabetes mellitus, předchozí transplantace, implantace mechanické srdeční podpory a transplantace pro vrozenou srdeční vadu (Stehlik 2012).

V průběhu transplantace je tedy srdce vystaveno řadě překážek, které mohou zhoršit ischemicko-reperfuční poškození myokardu a ovlivnit tím funkci srdečního štěpu. V délce ischemie jsme nepozorovali významný rozdíl mezi skupinami pacientů rozdělených podle pohlaví dárce. S výjimkou příčiny úmrtí nebyl žádný rozdíl v dalších předoperačních datech; u ženských dárců byl vyšší výskyt intracerebrálních hemoragií.

Mozková smrt je provázána řadou patofyziologických dějů, které mohou způsobit závažné poškození srdečního štěpu (Ranasinghe a Bonser 2011). Srdeční selhání, které může progredovat až do kardiogenního šoku vyžadujícího inotropní podporu a zvýšený výskyt arytmií jako důsledek dysbalance autonomního nervového systému v souvislosti s poraněním

mozku, popisuje i Mierzewska-Schmidt a Gawecka (2015). Tento jev se vyskytuje taky u subarachnoidálního krvácení, jež je častou příčinou úmrtí vedoucí k zařazení do transplantačního dárcovského programu. Ve sledovaném souboru však nebyl zvýšený výskyt této příčiny mozkové smrti ani u jedné skupiny. Zhang a spol. (2015) dokonce zjistili, že plazmatická hladina kardiospecifického troponinu T koreluje s poškozením myokardu a závažností poškození mozku. Souvislost plazmatické koncentrace hs-cTnT s příčinou mozkové smrti dárce jsme v naší práci nepozorovali. Předpokládáme že, mozková smrt je mnohem rozsáhlejší a komplexnější proces bez ohledu na jeho příčinu.

V odborné literatuře existuje jen pár studií zkoumajících vztah plazmatických hladin hs-cTnT v souvislosti s potransplantačními výsledky. Erbel a spol. (2013) analyzovali prediktivní sílu hs-cTnT u 141 pacientů po transplantaci srdce. Zjistili, že u pacientů, kteří zemřeli do jednoho roku od transplantace, byly plazmatické hladiny hs-cTnT v šestém týdnu po transplantaci významně vyšší. Určili následně hladinu hs-cTnT v šestém týdnu jako prediktivní faktor jednorocní mortality. Stanovení hs-cTnT nebo vysoce citlivého srdečního troponinu I (hs-cTnI) může být také užitečné pro vyloučení či potvrzení akutní rejekce po transplantaci srdce, jak bylo popsáno ve studiích Méndeze a spol. (2014), Patela a spol. (2014) a Ahna a spol. (2015).

Byly publikovány studie, které mezi faktory negativně ovlivňující přežívání po transplantaci srdce zahrnují i ženské pohlaví dárce. Ať už se jednalo o zkušenosti jednotlivých transplantačních center (Bryan a spol. 1996, McCarthy a spol. 1998, Tsai a spol. 2002, Solomon a spol. 2004), či multicentrické studie vycházející ze statistik registru ISHLT. Ženské pohlaví dárce bylo identifikováno jako rizikový faktor jednorocní mortality po transplantaci srdce u dospělých pacientů, kteří podstoupili transplantaci v letech 1995 až 1998. Avšak u pacientů, kteří byli transplantováni v letech 1999 až 2002, nebylo ženské pohlaví dárce jako rizikový faktor identifikováno (Taylor a spol. 2004). Zmíněná nesourodost výsledků je vysvětlována nejednotnou kolekcí dat z různých časových období a z různých center, která mají odlišné strategie a zkušenosti (Al-Khaldi a spol. 2006).

Nicméně v dostupné literatuře dosud nebyla uvedena žádná práce, která by se věnovala problematice pohlavních rozdílů ve výskytu nekrózy a apoptózy v dárcovském srdci při transplantaci srdce. Přitom rozdílná odpověď srdečního svalu na nedostatek kyslíku během ischémie srdečního štěpu v závislosti na pohlaví dárce může být jednou z příčin rozdílných výsledků po transplantaci srdce (Iyer a spol. 2011).

Možným vysvětlením horších klinických výsledků u dárců srdce ženského pohlaví je rozdíl v hmotnosti srdce. Ženská srdce mají obecně o 15-30% nižší hmotnost než srdce mužská. Tento rozdíl je primárně způsoben odlišnou fyzickou konstitucí; relativní srdeční hmotnost je však také výrazně nižší u žen než u mužů (Ošťádal a spol. 2009). I přes respektování hmotnostního poměru a konstituce pacientů při výběru vhodného dárce, může tato skutečnost hrát roli v adaptaci ženského srdce v těle mužského příjemce a to i z dlouhodobého hlediska (Al-Khalidi a spol. 2006). Pro eliminaci uvedených faktů jsme přepočítali naměřené hodnoty hs-TnT na jednotku hmotnosti srdeční tkáně. Vzhledem k tomu, že vážení dárcovských srdcí během transplantace nebylo prakticky proveditelné, byla hmotnost obou srdečních komor vypočtena pomocí vzorců uvedených v literatuře (Reed a spol. 2014).

Naše výsledky ukazují na větší subklinické poškození ženského dárcovského srdce již před odběrem orgánu. Vyšší plazmatické koncentrace hs-cTnT, přepočtené na jednotku hmotnosti srdeční tkáně, jsme detekovali nejen těsně před odběrem srdečního štěpu, ale i po celé sledované období po transplantaci srdce; s maximálními rozdíly 24 hodin po ukončení ischemie a týden po transplantaci.

Vliv perioperační ischemie jsme mohli pozorovat i v nárůstu apoptotických buněk detekovaných pomocí metody TUNEL u obou pohlaví. Počet TUNEL pozitivních buněk byl týden po transplantaci významně vyšší než před transplantací, a to jak u mužských dárců, tak i ve skupině ženských dárců. Nicméně se nám nepodařilo prokázat rozdíl ve výskytu apoptózy mezi mužskými a ženskými dárci srdečního štěpu.

Z experimentálních prací vyplývá, že samičí srdce je odolnější k ischemicko-reperfučnímu poškození než samčí srdce (Ošťádal a spol. 2009, Lagranha a spol. 2010, Fukumuto a spol. 2012, McKee a spol. 2013, Kolář a Ošťádal 2013, Ciocci Pardo a spol. 2018). Nicméně z našich výsledků se zdá, že ženský myokard při transplantaci je citlivější k ischemicko-reperfučnímu poškození než myokard mužský. Tato skutečnost by mohla přispět k vysvětlení horších potransplantačních klinických výsledků při použití ženského srdečního štěpu.

Taktéž je nutno poznamenat, že experimentální práce byly prováděny na zvířatech bezprostředně uvedených do anestezie, případně okamžitě po usmrcení pokusného zvířete (např. dekapitací), tedy na srdcích, které nebyly vystaveny destruktivním pochodům probíhajících při mozkové smrti. Podobně je tomu i u klinických studií, které zahrnují

pacienty s akutním infarktem, pacienty po perkutánních nebo kardiochirurgických intervencích, tedy osoby, u nichž nedošlo k mozkové smrti. Transplantace srdce je tak jedinou situací, kdy se setkáváme se srdcem poškozeným v rámci patofyziologických změn, jež probíhají při smrti mozku. Se zřetelem k tomu, že vyšší plazmatická koncentrace srdečního troponinu T, přepočtená na jednotku hmotnosti srdeční tkáně, je u dárců ženského pohlaví přítomna již před odběrem srdce, můžeme předpokládat odlišné poškození ženského dárcovského myokardu při smrti mozku. Z tohoto důvodu by se další výzkum měl zaměřit na hledání pohlavních rozdílů v poškození srdečního štěpu při mozkové smrti. Pochopení zmíněných patofyziologických pochodů by mohlo vést k lepší selekci vhodných dárců nebo k úpravě péče o dárce srdce v závislosti na pohlaví a tím přispět ke zlepšení klinických výsledků srdeční transplantace.

Khush a spol. zveřejnili v roce 2012 práci, ve které shledávají odlišnost pohlaví příjemce a dárce jako hlavní nepříznivý faktor pro krátkodobé, ale i dlouhodobé přežívání po transplantaci srdce. Horší výsledky u mužů, kterým bylo při transplantaci implantováno ženské srdce, byly popsány z různých transplantačních center (Prendergast a spol. 1998, Al-Khalidi a spol. 2006, Kittleson a spol. 2011). Taktéž závěry velkých multicentrických studií podporují tyto výsledky. Podle zveřejněných údajů registru ISHLT z roku 2012 mají muži, kterým bylo transplantováno ženské srdce, horší 5-leté přežití než muži, kterým bylo implantováno srdce mužské. Pro 5-leté přežití je tento fakt hraničně signifikantní, avšak u 15-letého přežití je již statisticky významný (Stehlik a spol. 2012). Lund a spol. (2015) analýzou dat z ISHLT registru dokonce označuje příjemce muže s dárcovským štěpem od ženy jako rizikový faktor jednoroční mortality. Z výsledků databáze United Network for Organ Sharing (UNOS) bylo zjištěno, že nejlepšího 5-letého přežívání je dosaženo při kombinaci pohlaví příjemce a dárce, kdy příjemcem i dárce je muž. A naopak nejhorších výsledků pro 5-leté přežívání je dosaženo při kombinaci, kdy příjemce je muž a dárce je žena (Weiss a spol. 2009).

V transplantační literatuře jsou diskutovány i genetické a hormonální faktory, které mohou, alespoň částečně, vysvětlovat uvedené rozdíly. Jak bylo uvedeno v kapitole o pohlavních rozdílech, u dospělých mužů dochází za jeden rok k úbytku přibližně 64 miliónů myocytů s kompenzatorní hypertrofií zbývajících srdečních buněk, zatímco u žen se počet myocytů v průběhu života prakticky nemění (Olivetti 1995). Je-li tato skutečnost podmíněna hormonálně, pak se lze domnívat, že po transplantaci ženského srdce do mužského těla, může k obdobným změnám docházet i v transplantovaném orgánu. Tyto změny by mohly být

vyjádřeny dokonce s ještě větší intenzitou, neboť srdce je nejen zbaveno protektivního vlivu ženských pohlavních hormonů, ale současně je zároveň vystaveno působení mužských pohlavních hormonů (Al-Khalidi a spol. 2006). Odlišnost v apoptóze zde hraje nesporně významnou roli. Množství apoptózy podléhajících myokardiálních buněk bylo sledováno v normálních lidských srdcích různého stáří (Mallat a spol. 2001) i ve stěně koronárních arterií (Boddaert a spol. 2005). U obou sledování došli autoři k zajímavému poznatku, že výskyt tohoto typu buněčné smrti je u mužů 3x vyšší než u žen a že věk jedinců tento poměr neovlivnil.

Přítomnost apoptózy byla již dříve zkoumána jak v transplantovaných srdcích, tak i v explantovaných srdcích, které nebyly z různých důvodů akceptovány k transplantaci. Birks a spol. (2000) prokázali zvýšenou expresi kaspáz v dysfunkčních srdečních štěpech ve srovnání se štepem s dobrou funkcí obou komor. Výrazně vyšší expresi genů účastnících se apoptózy (BAX, kaspázy-3 a FasL) v dárcovských srdcích ve srovnání s kontrolní skupinou pacientů popsal také Stoica a spol. (2003). V prospektivní studii kolektivu autorů (Chalabreysse a spol. 2004) byla hodnocena velikost apoptózy z bioptických vzorků pravé komory srdeční u dárců s prokázanou smrtí mozku. Autoři potvrdili, že mozková smrt vyvolává apoptózu v myokardu pravé komory, nicméně vysoký apoptotický index nekoreloval s následnou funkcí myokardu a nepredikoval selhání srdečního štepů v prvním roce po transplantaci. Ač se uvedené práce zabývají apoptózou v myokardu transplantovaných srdcí, nebyly dosud publikovány žádné studie zkoumající tento proces za modifikovaných podmínek, kdy je ženské srdce transplantováno mužskému příjemci a naopak.

S respektováním transplantačních statistik našeho pracoviště z předchozích let jsme vytvořili čtyři pracovní skupiny podle pohlaví příjemce a dárce, do kterých jsme postupně zařazovali transplantované pacienty. Zjišťovali jsme četnost výskytu apoptózy v uvedených skupinách a porovnávali rozdíly mezi jednotlivými skupinami (Studie 2). Skupiny pacientů se nelišily v demografických datech ani v žádném předoperačním parametru, ať už z hlediska charakteristiky dárců či příjemců. Žádná skupina tedy nezahrnovala nějaký rizikový faktor (délka ischemie, vyšší věk dárce, významný nepoměr hmotnosti dárce a příjemce, chronické renální selhání u příjemce, diabetes mellitus, implantace mechanické srdeční podpory či transplantace pro vrozenou srdeční vadu; Stehlik 2012) pro krátkodobé či dlouhodobé přežívání po transplantaci srdce. V podstatě jediným rizikovým faktorem diskutovaným výše byla transplantace dárcovského štepů jednoho pohlaví do těla příjemce druhého pohlaví (*skupina 3, skupina 4*). V časném pooperačním období jsme zaznamenali výrazně vyšší

expresi kaspázy-3 ve *skupině 3* (příjemce muž – dárce žena) a v porovnání se *skupinou 2* (příjemce žena – dárce žena) byl tento rozdíl statisticky významný. Vzhledem k tomu, že se jednalo o skupinu pacientů, ve které byl použit srdeční štěp ženy pro mužského příjemce, mohla by tato skutečnost potvrzovat klinická pozorování, že je ženský dárce rizikem pro mužského příjemce s ohledem na jednoroční mortalitu (Al-Khaldi a spol. 2006, Kittleson a spol. 2011, Lund a spol. 2015). Ovšem je zajímavé, že v dalším průběhu sledování došlo v této skupině (*skupina 3*) k významnému poklesu kaspázy-3 a naopak ve *skupině 2* k významnému nárůstu exprese kaspázy-3, až se tento rozdíl mezi oběma skupinami obrátil v šestém měsíci od transplantace. Což by již nepotvrzovalo uvedenou myšlenku, zvláště bereme-li v úvahu, že apoptóza v myokardu je jednou z příčin horších potransplantačních výsledků. V jednoletém i dvouletém sledování již dále nebyly rozdíly v expresi tohoto proapoptotického proteinu.

Z hlediska dlouhodobých výsledků po transplantaci může být nepříznivá i opačná kombinace, tedy pokud je příjemcem žena a dárce muž (Kittleson a spol., 2011). Rovněž z ISHLT registru vyplývá, že ženy s těhotenstvím v anamnéze mají horší 5-leté přežívání, pokud jim bylo transplantováno mužské srdce, než muži, kterým bylo transplantováno srdce od mužského dárce (Stehlik a spol. 2012). My jsme, na rozdíl od zmíněných faktů, pozorovali půl roku po transplantaci významně menší expresi kaspázy-3 (tedy menší apoptotickou odpověď mužského myokardu v těle ženy) ve skupině, kde byla příjemce žena a dárce muž oproti skupině, kde byla příjemcem i dárce žena.

Co se týká antiapoptotického proteinu Bcl-2, tak jsme nezjistili významné rozdíly v jeho expresi mezi skupinami v žádném monitorovaném časovém období. Ani pomocí metody TUNEL jsme nedetekovali významné rozdíly mezi skupinami ve výskytu apoptóze podléhajících srdečních buněk. Nicméně jistě stojí za povšimnutí, že apoptóza v myokardu přítomná je, a od jednoho týdne po transplantaci dochází k významnému nárůstu TUNEL pozitivním myocytů ve všech skupinách v porovnání s předtransplantačními hodnotami.

Selhání srdečního štěpu je obávanou komplikací po transplantaci srdce a provází ji vysoká mortalita. Incidence PGD se v literatuře pohybuje od 2,3% do 28,2% (D'Alessandro a spol. 2010, Russo a spol. 2010, Segovia a spol. 2011, Marasco a spol. 2012). Ačkoliv patogeneze PGD není zcela jasná, má se za to, že ischemicko-reperfúzní poškození je jednou z hlavních příčin vyvolávající selhání myokardu po transplantaci, zejména při dlouhém trvání

ischémie (Iyer a spol. 2011). Diskutován je rovněž vliv mozkové smrti na poškození myokardu dárce (Ranasinghe a Bonser 2011, Mierzevska-Schmidt a Gawecka 2015).

Vzhledem k častým fatálním následkům PGD, je snaha identifikovat rizikové faktory korelující s touto komplikací v popředí zájmu transplantační medicíny. Role biomarkerů v predikci PGD je stále nevyjasněna. V literatuře jsou dostupné práce, které zkoumají souvislost zvýšených plazmatických koncentrací srdečních troponinů u dárců a PGD. Boccheciampe a spol. (2009) hodnotili korelaci mezi srdečním troponinem I a poruchou funkce myokardu u potencionálních dárců; srdečním troponinem I u dárců a časnou poruchou funkce myokardu po transplantaci, jednoletým přežíváním a výskytem rejekcí. Zjistili, že zvýšená hladina srdečního troponinu I u dárce byla spojena s myokardiální dysfunkcí dárcovského štěpu, což by mohlo napomoci při výběru vhodného dárce. Na druhou stranu nezjistili souvislost s pooperační dysfunkcí štěpu a jednoletým přežíváním. Khush a spol. (2007) v retrospektivní studii pozorovali, že zvýšení plazmatické koncentrace troponinu I (> 1.0 mcg/l) bylo spojeno s delší hospitalizací, ale nemělo vliv na nutnost užití mechanické podpory po transplantaci či mortalitu. Na druhou stranu Potapov a spol. (2001) prokázali, že výrazně zvýšené plazmatické koncentrace srdečních troponinů u dárce (troponin I > 1.6 mcg/l a troponin T > 0.1 mcg/l) jsou prediktory dysfunkce štěpu po transplantaci a doporučují proto stanovení jejich hladiny při selekci vhodných dárců.

Srdeční troponiny jsou dnes souhlasně doporučovány k detekci myokardiálního poškození. Jejich citlivější stanovení umožňuje poměrně nová metoda tzv. high sensitive metod, kterou jsme proto použili ke stanovení srdečního troponinu T v naší práci. Vzhledem k nedávnému zavedení této metody do praxe, můžeme v odborné literatuře dohledat jen několik prací (zmíněných výše), které používají vysoce senzitivní stanovení srdečních troponinů u transplantovaných pacientů (Erbel a spol. 2012, Méndez a spol. 2014, Patel a spol. 2014 a Ahn a spol. 2015).

Neopominutelnou roli při rozvoji primárního selhání štěpu sehraává i programovaná buněčná smrt. Jak již bylo výše zmíněno, Birks a spol. (2000) prokázali zvýšenou expresi kaspáz v dysfunkčních srdečních štěpech ve srovnání se štěpy s dobrou funkcí obou komor. Stoica a spol. (2003) pozorovali zvýšenou expresi genů spojených s apoptózou (Bcl-2, kaspáza-3, FasL) v dárcovských srdcích ve srovnání s kontrolní skupinou. Chalabreysse a spol. (2004) prokázali, že mozková smrt měla za následek indukci apoptózy v pravé komoře. Autoři prokázali, že mozková smrt bezpochyby vede k aktivaci apoptózy, ale její výskyt a intenzita pravděpodobně není spolehlivým prediktorem dysfunkce dárcovského srdečního štěpu v potransplantačním období. Souvislost mezi zvýšenou expresí proapoptotických

markerů (kaspázy-3) v dárcovských allograftech a primárním selháním štěpu po srdeční transplantaci dokumentuje pouze jediná studie (Marasco a spol. 2014). Nicméně v našem souboru pacientů jsme nepozorovali souvislost mezi markery obou hlavních typů buněčné smrti (nekrózy a apoptózy) a rozvojem primárního selhání štěpu po transplantaci srdce. Je ovšem třeba zmínit, že na rozdíl od našeho pozorování a pozorování Chalabreysse a spol., byly ke stanovení apoptózy ve studii Marasca a kolektivu autorů (2014) použity vzorky ze srdečních síní a nikoliv ze srdečních komor. Nedetekovali tedy apoptózu komorových myocytů, což může znamenat v konečném důsledku i rozdílné závěry.

7. ZÁVĚR

Hlavní výsledky předkládané dizertační práce lze stručně shrnout v následujících bodech

- i. U dárců srdce ženského pohlaví jsme pozorovali větší subklinické poškození myokardu. Zjistili jsme hlavně větší stupeň nekrotického poškození, nepozorovali jsme rozdíly v apoptóze, ač její zvýšená přítomnost v myokardu byla detekovatelná pomocí metody TUNEL. Vyšší plazmatické koncentrace srdečního troponinu T přepočtené na jednotku hmotnosti srdeční tkáně jsme zaznamenali již před odběrem srdečního štěpu, což může znamenat, že u žen dochází k většímu poškození myokardu při smrti mozku. Vyšší plazmatická koncentrace troponinu T u pacientů, kterým bylo transplantováno ženské srdce, přetrvávala i po transplantaci srdce, s maximálními rozdíly 24 hodin po ukončení ischemie a týden po transplantaci. Toto zjištění by mohlo vysvětlovat horší klinické výsledky při použití ženských allograftů. Nepotvrdili jsme tedy hypotézu, že ženský srdeční štěp při transplantaci je odolnější k ischemii než mužský štěp. Naopak se ženský štěp jeví jako vnímavější k ischemicko-reperfuznímu poškození.
- ii. Nepozorovali jsme ovlivnění apoptózy v transplantovaném myokardu v závislosti na pohlaví dárce a příjemce. Ve střednědobém pooperačním období jsme zaznamenali větší expresi kaspázy-3 v ženském srdečním štěpu transplantovaném do mužského těla. V dalším sledování však exprese kaspázy-3 v této skupině klesla. Z dlouhodobého hlediska nebyly výrazné rozdíly v apoptóze u pacientů, kterým bylo transplantováno srdce od druhého pohlaví. Na druhou stranu ale apoptóza v myokardu přítomná byla. Zaznamenali jsme výrazný nárůst TUNEL pozitivních buněk u všech pacientů po transplantaci. K přesnějšímu zachycení všech buněk vstupujících do apoptotického procesu bude potřeba rozšířenější analýzy tohoto procesu jako např. stanovení apoptotických buněk pomocí elektronové mikroskopie, detekce apoptózy pomocí annexinu V průtokovou cytometrií, či detekce aktivity kaspáz metodou FLICA (Fluorochrome Inhibitor of Caspases). Rovněž podrobnější prozkoumání další možné cesty zániku buněk - nekroptózy, která nezávisí na aktivaci efektorových kaspázách, může přispět k lepšímu pochopení této problematiky. Nepotvrdili jsme

hypotézu, že ženský myokard u transplantovaných pacientů podléhá apoptóze méně než myokard mužský.

- iii. Neprokázáli jsme souvislost mezi monitorovanými markery buněčné smrti (nekrózy a apoptózy) v myokardu dárců a primárním selháním štěpu po transplantaci srdce. Bude pravděpodobně nutné podrobnější mapování signálních kaskád vedoucích k zániku kardiomyocytů a zaměřit se i na další typy buněčné smrti jako je např. autofagie.

Existenci pohlavních rozdílů v myokardu jednoznačně prokazují experimentální i některé klinické studie. Taky v naší práci jsme prokázali odlišnou vnímavost ženského a mužského srdce k ischemii. Přesné vysvětlení těchto rozdílů není zatím uspokojivě podáno. Prohlubující se výzkum přináší nové poznatky, na které by měl být brán zřetel již i v klinické medicíně. Transplantace srdce a následná dlouhodobá pooperační péče je jedním z nejsložitějších oborů medicíny. Výsledky práce by mohly přispět k ucelení poznatků a mohou být zároveň zdrojem pro selektivnější výběr vhodných dárců a tím přispět k lepším výsledkům srdečních transplantací.

8. LITERATURA

- ABOU-GHALI M, STIBAN J. Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi J Biol Sci*, 2015, 22(6), p. 760-72.
- AHN KT, CHOI JO, LEE GY, ET AL. Usefulness of high-sensitivity troponin I for the monitoring of subclinical acute cellular rejection after cardiac transplantation. *Transplant Proc*, 2015, 47(2), p. 504-10.
- AL-KHALDI A, OYER PE, ROBBINS RC: Outcome analysis of donor gender in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 2006, 25, p. 461-8.
- ARIELI Y, GURSAHANI H, EATON MM, et al. Gender modulation of Ca²⁺ uptake in cardiac mitochondria. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 37, p. 507–513.
- ASHKENAZI A, DIXIT VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998, 281, p. 1305–8.
- BARAN K, RODRIGUEZ, D, GREEN D. The DNA Damage Response Mediates Apoptosis and Tumor Suppression. *Cell Death: Mechanism and Disease*, 2013, 7, p. 135-165.
- BARNARD CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S Afr Med J*, 1967, 41, p. 1271-4.
- BAZETT H. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart*, 1920, 7, p. 353–370.
- BERTHELET J, DUBREZ L. Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs). *Cells*, 2013, 2(1), p. 163-187.
- BESIK J, SZARSZOI O, HEGAROVA M, et al. Non-Fontan Adult Congenital Heart Disease Transplantation Survival Is Equivalent to Acquired Heart Disease Transplantation Survival. *Ann Thorac Surg*, 2016, 101, p. 1768-73.
- BIRKS EJ, YACOUN MH, BURTON PS, et al. Activation of apoptotic and inflammatory pathways in dysfunctional donor hearts. *Transplantation*, 2000, 70, p. 1498-1506.
- BOCCHECIAMPE N, AUDIBERT G, RANGEARD O, et al. Serum troponin Ic values in organ donors are related to donor myocardial dysfunction but not to graft dysfunction or rejection in the recipients. *Int J Cardiol*, 2009, 133, p. 80-86.
- BODDAERT J, MALLAT Z, DODNES P, et al. Age and gender effects on apoptosis in the human coronary arterial wall. *Mech Ageing Dev*, 2005, 123, p. 678-684.

BROUCKAER G, KALAI M, KRYSKO DV et al. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Mol Biol Cell*, 2004, 15 (3), p. 1089–1100.

BROUCKAERT G, KALAI M, KRYSKO DV, et al. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Molecular Biology of the Cell*, 2004, 15 (3), p. 1089–1100.

BURKE JH, EHLERT FA, KRUSE JT, et al. Gender-specific differences in the QT interval and the effect of autonomic tone and menstrual cycle in healthy adults. *Am J Cardiol*, 1997, 79(2), p. 178-8.

BUTTRICK P, SCHEUER J. Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly. *Circulation*, 1992, 86, p. 1336-8.

CAPASSO JM, REMILY RM, SMITH RH, et al. Sex differences in myocardial contractility in the rat. *Basic Res Cardiol*, 1983, 78(2), p. 156-71.

CERNY S, MOKRACEK A, POKORNA E, et al. Techniques, tactics and organizational aspects of distant procurement of donor hearts for transplantation. Experience at the Department of Cardiovascular and Transplantation Surgery of IKEM with 100 distant procurement of donor hearts. *Rozhl Chir*, 1998, 77, p. 165-70.

CIOCCI PARDO A, SCURI S, GONZÁLEZ ARBELÁEZ LF, et al. Survival kinase-dependent pathways contribute to gender difference in the response to myocardial ischemia-reperfusion and ischemic post-conditioning. *Cardiovascular Pathology*, 2018, 33, p. 19 – 26.

CLARKE SJ, McSTAY GP, HALESTRAP APOD. Sangliferin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporine A. *J Biol Chem*, 2002, 276, p. 34793-99.

COHN LH, EDMUNDS LH Jr. Cardiac Surgery in the Adult (2nd ed.). *New York, McGraw-Hill*, 2003, p. 1427-61.

COLOM B, OLIVER J, ROCA P, et al. Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H₂O₂ production and oxidative damage. *Cardiovasc Res*, 2007, 74, p. 456–465.

D'ALESSANDRO C, AUBERT S, GOLMARD JL, et al. Extra-corporeal membrane oxygenation temporary support for early graft failure after cardiac transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2010, 37, p. 343-349.

DEL RIZZO DF, MENKIS AH, PFLUGFELDER PW, et al. The role of donor age and ischemic time on survival following orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 1999, 18, p. 310-9.

- DEL RIZZO DF, MENKIS AH, PFLUGFELDER PW, et al. The role of donor age and ischemic time on survival following orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 1999, 18, p. 310-9.
- DHALLA NS, WANG X, BEAMISH RE. Intracellular calcium handling in normal and failing hearts. *Exp Clin Cardiol*, 1996, 1, p. 7-21.
- DICKENS LS, BOYD RS, JUKES-JONES R, et al. A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Molecular Cell*, 2012, 47 (2), p. 291–305.
- DI GIOSIA P, GIORGINI P, STAMERRA CA, et al. Gender Differences in Epidemiology, Pathophysiology, and Treatment of Hypertension. *Curr Atheroscler Rep*, 2018, 20, 13.
- DUBEY RK, OPARIL S, IMTHURN B, et al. Sex hormones and hypertension. *Cardiovasc Res*. 2002, 53, p. 688–708.
- DUWALL WL. Cardiovascular disease in women. *Mt Sinai J Med*, 2003, 70(5), p. 293-305.
- ELMORE S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, 2007, 35, p. 495 – 516.
- ERBEL C, TASKIN R, DOESCH A, et al. High-sensitive Troponin T measurements early after heart transplantation predict short- and long-term survival. *Transpl Int*, 2013, 26, p. 267-272.
- FADEEL B, ORRENIUS S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med*, 2005, 258(6), p. 479-517.
- FEJFAR Z. Prevention against ischaemic heart disease: a critical review. In: OLIVER MF (Ed.), *Modern trends in cardiology – 3*. London and Boston: Butterworths, 1975, p. 465-499.
- FUKUMOTO T, YAMASHITA N, TAWA M, et al. Sex differences in postischemic cardiac dysfunction and norepinephrine overflow in rat heart: the role of estrogen against myocardial ischemia-reperfusion damage via an NO-mediated mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012, 60, p. 269-275.
- GALLUZZI L, BRAVO-SAN PEDRO JM, VITALE I, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*, 2015, 22(1), p. 58-73.
- GARRIDO C, GALLUZZI L, BRUNET M, et al. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 2006, 13, p. 1423–33.
- GIMENEZ-CASSINA A, DANIAL NN. Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by BCL-2 family proteins. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26 (4), p. 165 – 175.

- GRANDI AM, VENCO A, BARZIZZA F, et al. Influence of age and sex on left ventricular anatomy and function in normals. *Cardiology*, 1992, 81, p. 8–13.
- GROSS A, MCDONNELL JM, KORSMEYER SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 1999, 13, p. 1899–1911.
- GUERRA S, LERI A, WANG X, et al. Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ Res*, 1999, 85, p. 856–866.
- GUICCIARDI ME, JUSTIN LM, STEVEN FB, et al. Cellular inhibitor of apoptosis 1 (cIAP-1) degradation by caspase-8 during TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *Experimental Cell Research*, 2011, 317 (1), p. 107–16.
- HALESTRAP AP, CLARKE SJ, JAVADOV SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*, 2004, 61, p. 372–385.
- HAN SH, BAE JH, HOLMES DR, et al. Sex differences in atheroma burden and endothelial function in patients with early coronary atherosclerosis. *Eur Heart J*, 2008, 29, p. 1359–69.
- HARDY JD, KURRUS FD, CHAVEZ CM, et al. Heart transplantation in man. Developmental studies and report of a case. *JAMA*, 1964, 188, p. 1132–40.
- HAYASHI T, FUKUTO JM, IGNARRO LJ, et al. Gender differences in atherosclerosis: possible role of nitric oxide. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995, 26, p. 792–802.
- HILL MM, ADRAIN C, DURIEZ PJ, et al. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J*, 2004, 23, p. 2134–45.
- HIMMELMANN A, SVENSSON A., HANSSON L. Influence of sex on blood pressure and left ventricular mass in adolescents: the Hypertension in Pregnancy Offspring Study. *J Human Hypertens*, 1994, 8, p. 485–490.
- HSU H, XIONG J, GOEDEL DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*, 1995, 81, p. 495–504.
- HULLEY S, GRANDY D, BUSH T, et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA*, 1998, 280, p. 605–612.
- CHALABREYSSE L, LEROUX C, OBADIA JF, et al. Apoptosis in right-ventricle biopsy is not predictive of graft survival. *Transpl Int*, 2004, 17, p. 362–5.
- CHIU WT, CHANG HA, LIN YH, et al. Bcl-2 regulates store-operated Ca²⁺ entry to modulate ER stress-induced apoptosis. *Cell Death Discovery*, 2018, 4, 37...
 nepřehodit CHEN QM, TU VC. Apoptosis and heart failure: mechanisms and therapeutic implications. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2002, 2, p. 43.

- CHU SH, Sutherland K, Beck J, et al. Sex differences in expression of calcium-handling proteins and betaadrenergic receptors in rat heart ventricle. *Life Sci*, 2005, 76, p. 2735–2749.
- IYER A, KUMARASINGHE G, HICKS M, et al. Primary graft failure after heart transplantation. *J Transplant*, 2011, 175768.
- JIN Z, EL-DEIRY WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 2005 4(2), p. 139-163.
- KARDYS I, VLIEGENTHART R, OUDKERK M, HOFMAN A, et al. The female advantage in cardiovascular disease: do vascular beds contribute equally? *Am J Epidemiol*, 2007, 166, p. 403-12.
- KARMAZYN M. The 1990 Merck Frosst award. Ischemic and reperfusion injury in the heart. Cellular mechanism and pharmacological interventions. *Can J Physiol*, 1990, 69, p. 719-730.
- KASKI JC. Cardiac syndrome X in women: the role of oestrogen deficiency. *Heart*, 2006, 92, Suppl3:iii5-9.
- KHUSH KK, KUBO JT, DESAI M: Influence of donor and recipient sex mismatch on heart transplant outcomes: analysis of the International Society for Heart and Lung Transplantation Registry. *J Heart Lung Transplant*, 2012, 31, p. 459-66.
- KHUSH KK, MENZA RL, BABCOCK WD, et al. Donor cardiac troponin I levels do not predict recipient survival after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 2007, 26, p. 1048-1053.
- KILIC A, WEISS ES, GEORGE TJ, et al. What predicts long-term survival after heart transplantation? An analysis of 9,400 ten-year survivors. *Ann Thorac Surg*, 2012, 93, p. 699-704.
- KITTLESOM MM, SHEMIN R, PATEL JK, et al. Donor-recipient sex mismatch portends poor 10-year outcomes in a single-center experience. *J Heart Lung Transplant*, 2011, 30, p. 1018-22.
- KOBASHIGAWA J, ZUCKERMANN A, MACDONALD P, et al. Consensus Conference participants: Report from a consensus conference on primary graft dysfunction after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 2014, 33, p. 327-40.
- KOCH A, ROTH W, STEFFEK TM, et al. Impact of apoptosis in acute rejection episodek after heart transplantation: imunohistochemical examination of right ventricular myocardial biopsie. *Trans Proceed*, 2008, 40, p. 943-946.
- KOLAR F, OSTADAL B. Sex differences in cardiovascular function. *Acta Physiol (Oxf)*, 2013, 207, p. 584-7.

- KROEMER G, GALLUZZI L, VANDENABEELE P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*, 2009, 16(1), p. 3-11.
- KRUEGER A, SCHMITZ I, BAUMANN S, et al. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem*, 2001, 276, p. 20633-20640.
- KUWANA T, BOUCHIER-HAYES L, CHIPUK JE, et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular Cell*, 2005, 17 (4), p. 525–35.
- LAGRANHA CJ, DESCHAMPS A, APONTE A, et al. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. *Circ Res*, 2010, 106, p. 1681-91.
- LEBLANC N, CHARTIER D, GOSSELIN H, et al. Age and gender differences in excitation-contraction coupling of the rat ventricle. *J Physiol*, 1998, 511, p. 533-48.
- LEDGERWOOD EC, MORISON IM. Targeting the apoptosome for cancer therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2009, 15 (2), p. 420–24.
- LEINWAND LA. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest*, 2003, 112, p. 302–304.
- LIOTTA, L. A. A E. KOHN. Anoikis: cancer and the homeless cell. *Nature*, 2004, 430(7003), p. 973-974.
- LIU FT, NEWLAND AC, JIA L. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 310, p. 956–62.
- LIU XK, WANG W, EBERT SN, et al. Female gender a risk factor for torsades de pointes in an in vitro animal model, *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999, 34, p. 287–294.
- LOCKSLEY RM, KILLEEN N, LENARDO MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001, 104, p. 487–501.
- LUND LH, EDWARDS LB, KUCHERYAVAYA AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Heart Transplantation Report--2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *J Heart Lung Transplant*, 2015, 34, p. 1244-54.
- LUND LH, KHUSH KK, CHERIKH WS, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Heart Transplantation Report-2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 2017, 36, p. 1037-1046.

- MALLAT Z, DODNES P, COSTAGLIOLA R, et al. Age and gender effects on cardiomyocyte apoptosis in the normal human heart. *J Geront*, 2001, 56, p. 719-723.
- MARASCO SF, KRAS A, SCHULBERG E, et al. Impact of warm ischemia time on survival after heart transplantation. *Transplant Proc*, 2012, 44, p. 1385-9.
- MARASCO SF, SHEERAN FL, CHAUDHURI K, et al. Molecular markers of programmed cell death in donor hearts before transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 2014, 33, p. 185-193.
- MARSH JD, LEHMANN MH, RITCHIE RH, et al. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation*, 1998, 98, p. 256–261.
- MATHUR P, OSTADAL B, ROMEO F, et al. Gender-Related Differences in Atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2015, 29, p. 319-27.
- McILWAIN DR, BERGER T, MAK TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(4), a008656.
- MCKEE LA, CHEN H, REGAN JA, et al. Sexually dimorphic myofilament function and cardiac troponin I phosphospecies distribution in hypertrophic cardiomyopathy mice. *Arch Biochem Biophys*, 2013, 535, p. 39-48.
- MÉNDEZ AB, CARDONA M, ORDÓÑEZ-LLANOS J, et al. Predictive value of high-sensitive troponin T to rule out acute rejection after heart transplantation. *Rev Esp Cardiol*, 2014, 67, p. 775-776.
- MIERZEWSKA-SCHMIDT M, GAWECKA A. Neurogenic stunned myocardium - do we consider this diagnosis in patients with acute central nervous system injury and acute heart failure? *Anaesthesiol Intensive Ther*. 2015, 47(2), p. 175-80.
- MILLER VM, Sex-based differences in vascular function. *Womens Health (Lond)*, 2010, 6, p. 737-52.
- MOHRI M, KOYANAGI M, EGASHIRA K, et al. Angina pectoris caused by coronary microvascular spasm. *Lancet*, 1998, 351, 1165-9.
- MURPHY E, STEENBERGEN C, Estrogen regulation of protein expression and signaling pathways in the heart. *Biol Sex Differ*, 2014, 10, p. 5-6.
- NAKAJIMA W, TANAKA N. Synergistic induction of apoptosis by p53-inducible Bcl-2 family proteins Noxa and Puma. *J Nippon Med Sch*, 2007, 74(2), p. 148-57
- NUZZO A, ROSSI R, MODENA MG. Hypertension alone or related to the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2010, 8, p. 1541–1548.
- OLIVETTI G, GIORDANO G, CORRAADI D, et al. Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol*, 1995, 26, p. 1068-1079.

OSTADAL B, KOLAR F. Cardiac Ischemia: From Injury to Protection. Kluwer, Boston, 1999.

OŠŤÁDAL B, KOLÁŘ F. Experimentální modely hypoxie a ischemie myokardu. *Ceskoslov. Fyziol.* 1988, 37, p. 15-32.

OSTADAL B, NETUKA I, MALY J, et al. Gender differences in cardiac ischemic injury and protection--experimental aspects. *Exp Biol Med (Maywood)* , 2009, 234(9), p. 1011-9.

OŠŤÁDAL B, PROCHÁZKA J, PELOUCH V, et al. Comparison of cardiopulmonary responses of male and female rats to intermittent high altitude hypoxia. *Physiol Bohemoslov* , 1984, 33, p. 129–138.

OŠŤÁDAL B, VÍZEK M. Patologická fyziologie srdce a cév. Karolinum, Praha, 2005.

OTT M, ZHIVOTOVSKY B, ORRENIUS S. Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 2007, 14, p. 1243–1247.

OUYANG P, MICHOS ED, KARAS RH. Hormone replacement therapy and the cardiovascular system lessons learned and unanswered questions. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47, p. 1741–1753.

PATEL PC, HILL DA, AYERS CR, et al. High-sensitivity cardiac troponin I assay to screen for acute rejection in patients with heart transplant. *Circ Heart Fail*, 2014, 7(3), p. 463–469.

PETROS, AM, OLEJNICZAK ET, FESIK SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1644(2-3), p. 83-94.

PIPER HM, GARCIA-DORADO D, OVIZE M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 1998, 3, p. 291-300.

PIRK J, MÁLEK I, et al. Transplantace srdce. *Karolinum*, 2008

POTAPOV EV, IVANITSKAIA EA, LOEBE M, et al. Value of cardiac troponin I and T for selection of heart donors and as predictors of early graft failure. *Transplantation*, 2001, 71, p. 1394-400.

PRENDERGAST TW, FURUKAWA S, BEYER AJ 3RD, et al. The role of gender in heart transplantation. *Ann Thorac Surg*, 1998, 65, p. 88-94.

RANASINGHE AM, BONSER RS. Endocrine changes in brain death and transplantation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2011, 25, p. 799-812.

RAUTAHARJU PM, MASON JW, AKIYAMA T. New age- and sex-specific criteria for QT prolongation based on rate correction formulas that minimize bias at the upper normal limits. *Int J Cardiol*, 2014, 174, p. 535-40.

RAUTAHARJU PM, ZHOU SH, WONG S, et al. Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can J Cardio*, 1992, 8, p. 690-5.

- RECKELHOFF JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension*, 2001, 37, p. 1199–1208.
- REED RM, NETZER G, HUNSICKER L, et al. Cardiac size and sex-matching in heart transplantation : size matters in matters of sex and the heart. *JACC Heart Fail*, 2014, 2, p. 73-83.
- REGITZ-ZAGROSEK V. Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5, p. 425–439.
- REIS SE, HOLUBKOV R, CONRAD SMITH AJ, et al. Coronary microvascular dysfunction is highly prevalent in women with chest pain in the absence of coronary artery disease: results from the NHLBI WISE study. *Am Heart J*, 2001, 141, p. 735-41.
- RICH-EDWARDS JW, MANSON JE, HENNEKENS CH, et al. The primary prevention of coronary heart disease in women. *N Engl J Med*, 1995, 332 p. 1758-1766.
- ROCK KL, KONO H. The inflammatory response to cell death. *Annual review of pathology*. 2008, 3, p. 99-126.
- ROGER VL, GO AS, LLOYD-JONES DM, et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2011, 123, p. e18-e209.
- ROSSOUW JE, ANDERSON GL, PRENTICE RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized control trial. *JAMA*, 2002, 288, p. 321–333.
- RUSSO MJ, IRIBARNE A, HONG KN, et al. Factors associated with primary graft failure after heart transplantation. *Transplantation*, 2010, 90 p. 444-450.
- SAELENS X, FESTJENS N, VANDE WALLE L, et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 2004, 23, p. 2861–74.
- SANGIORGI G, ROVERSI S, BIONDI ZOCCAI G, et al. Sex-related differences in carotid plaque features and inflammation. *J Vasc Surg*, 2015 57, p. 338-44.
- SÁNCHEZ-LÁZARO IJ, ALMENAR-BONET L, ROMERO-PELECHANO A, et al. Serum markers of apoptosis in the early period of heart transplantation. *Biomarkers*, 2012, 17, p. 254-60.
- SCARABELLI TM, GOTTLIEB RA. Functional and clinical repercussions of myocyte apoptosis in the multifaceted damage by ischemia/reperfusion injury: old and new concepts after 10 years of contributions. *Cell Death Differ*, 2004, 11 Suppl 2, p. S144-52.
- SEGOVIA J, COSÍO MD, BARCELÓ JM, et al., RADIAL: a novel primary graft failure risk score in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 2011, 30, p. 644-51.
- SCHAIBLE TF, SCHEUER J. Comparison of heart function in male and female rats. *Basic Res Cardiol*, 1984, 79(4), p. 402-12.

- SCHUNKERT H, DANSER AH, HENSE HW, et al. Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation*, 1997, 95, p. 39–45.
- SMETANA P, BATCHVAROV VN, HNATKOVA K, et al. Ventricular gradient and nondipolar repolarization components increase at higher heart rate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286, p. H131-6.
- SMYTH LA, MEADER L, XIAO F, et al. Constitutive expression of the anti-apoptotic Bcl-2 family member A1 in murine endothelial cells leads to transplant tolerance. *Clin Exp Immunol*, 2017, 188, p. 219-225.
- SOLOMON NA, MCGIVEN JR, ALISON PM, et al. Changing donor and recipient demographics in a heart transplantation program: influence on early outcome. *Ann Thorac Surg*, 2004, 77, p. 2096-102.
- STEHLIK J, EDWARDS LB, KUCHERYAVAYA AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th official adult heart transplant report - 2012. *J Heart Lung Transplant*, 2012, 31, p. 1052-64.
- STOICA SC, SATCHITHANANDA DK, ATKINSON C, et al. Heat shock protein, inducible nitric oxide synthase and apoptotic markers in the acute phase of human cardiac transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2003, 24, p. 932-9.
- STRAMBA-BADIALE M, LOCATI EH, MARTINELLI A, et al. Gender and the relationship between ventricular repolarization and cardiac cycle length during 24-h Holter recordings. *Eur Heart J*, 1997, 18, p. 1000-6.
- SUN H, MOHRI M, SHIMOKAWA H, et al. Coronary microvascular spasm causes myocardial ischemia in patients with vasospastic angina. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39, p. 847-51.
- SUSIN SA, DAUGAS E, RAVAGNAN L, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*, 2000, 192 (4), p. 571–80.
- TASKIN M, LALLAS TA, BARBER HR, et al. bcl-2 and p53 in endometrial adenocarcinoma. *Mod Pathol*, 1997, 10(7), p. 728-734.
- THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y. Caspases: enemies within. *Science*, 1998, 281(5381), p. 1312-6.
- TSUDA H, NING Z, YAMAGUCHI Y, et al. Programmed cell death and its possible relationship with periodontal disease. *J Oral Sci*, 2012, 54(2), p. 137-49.
- TURNER ME, FARKAS J, DUNMIRE J, et al. Which sry locus is the hypertensive Y chromosome locus? *Hypertension*, 2009, 53, p. 430–435.
- VACCARINO V, ABRAMSON JL, VELEDAR E, et al. Sex differences in hospital mortality after coronary artery bypass surgery: evidence for a higher mortality in younger women. *Circulation*, 2002, 105, p. 1176–81.

- VANDENABEELE P, GALLUZZI L, VANDEN BERGHE T, et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11, p. 700-714.
- VEINOT JP, GATTINGER DA, FLISS H. Early apoptosis in human myocardial infarcts. *Hum Pathol*, 1997, 28, p. 485.
- VILLARI B, CAMPBELL SE, SCHNEIDER J. Sex-dependent differences in left ventricular function and structure in chronic pressure overload. *Eur Heart J*, 1995, 16(10), p. 1410-9.
- WAGNER M., MORITZ A, VOLK T. Interaction of gonadal steroids and the glucocorticoid corticosterone in the regulation of the L-type Ca^{2+} current in rat left ventricular cardiomyocytes. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011, 202, p. 629–640.
- WAJANT H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 2002, 296, p. 1635–6.
- WEI J, CHEN S, XUE S, et al. Blockade of Inflammation and Apoptosis Pathways by siRNA Prolongs Cold Preservation Time and Protects Donor Hearts in a Porcine Model. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 9, p. 428-439.
- WEISS ES, ALLEN JG, PATEL ND, et al. The impact of donor-recipient sex matching on survival after orthotopic heart transplantation: analysis of 18 000 transplants in the modern era. *Circ Heart Fail*, 2009, 2, p. 401-8.
- WESTPHAL D, DEWSON G, CZABOTAR PE, et al. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(4), p. 521-31.
- WILLIS SN, FLETCHER JI, KAUFMANN T, et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science (New York, N.Y.)*, 2007, 315 (5813), p. 856–59.
- WILSON TA, NICOLOSI RJ, LAWTON CW, et al. Gender differences in response to a hypercholesterolemic diet in hamsters: effects on plasma lipoprotein cholesterol concentrations and early aortic atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1999, 146, p. 83-91.
- XU R-Y, ZHU X-F, YANG Y, et al. High-sensitive cardiac troponin T. *J Geriatr Cardiol*, 2013, 10(1), p. 102-109.
- XU Y, ARENAS IA, ARMSTRONG SJ. Estrogen improves cardiac recovery after ischemia/reperfusion by decreasing tumor necrosis factor alpha. *Cardiovasc Res*, 2006, 69, p. 836-844.
- YAHAGI K, DAVIS HR, ARBUSTINI E, et al. Sex differences in coronary artery disease: pathological observations. *Atherosclerosis*, 2015, 239, p. 260-7.
- ZHANG L, WANG Z, QI S. Cardiac Troponin Elevation and Outcome after Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2015, 24(10), p. 2375–2384.

ZHANG XP, VATNER SF, SHEN YT, et al. Increased apoptosis and myocyte enlargement with decreased cardiac mass; distinctive features of ageing male, but not female monkey heart. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 43, p. 487-491.

ZHENG X, LIAN D, WONG A, et al. Novel small interfering RNA-containing solution protecting donor organs in heart transplantation. *Circulation*, 2009, 120, p. 1099-107.

ZHENG X, ZANG G, JIANG J, et al. Attenuating Ischemia-Reperfusion Injury in Kidney Transplantation by Perfusing Donor Organs With siRNA Cocktail Solution. *Transplantation*, 2016, 100, p. 743-52.

Elektronický informační zdroj:

<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/receptors.htm>

9. Přehled vlastních publikací

Se vztahem k tématu dizertační práce:

1)

Sensitivity to perioperative ischemia/reperfusion injury in male and female donor myocardium.

Smetana M, Besik J, Netuka I, Maly J, Maluskova J, Lodererova A, Hoskova L, Franeková J, Pokorna E, Pirk J, Szarszoi O.

Physiol Res, 2017, 66(6), p. 949-957.

IF 1.461

2)

Biomarkers of cellular apoptosis and necrosis in donor myocardium are not predictive of primary graft dysfunction.

Szarszoi O, Besik J, **Smetana M**, Maly J, Urban M, Maluskova J, Lodererova A, Hoskova L, Tucanova Z, Pirk J, Netuka I.

Physiol Res, 2016, 65(2), p. 251-7.

IF 1.461

Další publikace:

3)

Non-Fontan Adult Congenital Heart Disease Transplantation Survival Is Equivalent to Acquired Heart Disease Transplantation Survival.

Besik J, Szarszoi O, Hegarova M, Konarik M, **Smetana M**, Netuka I, Pirk J, Maly J.

Ann Thorac Surg, 2016, 101(5), p. 1768-73.

IF 3.700

4)

Pulsatile pseudoaneurysm following a bentall procedure.

Smetana M, Pirk J, Kacer P, Szarszoi O.

J Card Surg, 2011, 26(6), p. 641-2.

IF 0.865